

Vol.58 No.1/2 06.2008



Landbauforschung

Landbauforschung (vTI Agriculture and Forestry Research) ist ein wissenschaftliches Publikationsorgan des Johann Heinrich von Thünen-Instituts (vTI), Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei. Die Zeitschrift wird vom vTI herausgegeben und erscheint vierteljährlich. Sonderhefte erscheinen nach Bedarf.

In der Zeitschrift werden Forschungsergebnisse aus der Ressortforschung des BMELV mit Bezug zur Land- und Forstwirtschaft und den Ländlichen Räumen veröffentlicht, einschließlich Forschungsergebnissen aus Kooperationsprojekten, an denen das vTI beteiligt ist.

Die Landbauforschung ist eine multidisziplinär ausgerichtete Zeitschrift, die die verschiedenen Facetten der Agrar- und Forstwissenschaft einschließt und besonderes Augenmerk auf deren interdisziplinäre Verknüpfung legt.

Englischsprachige Beiträge sind erwünscht, damit die Forschungsergebnisse einem möglichst breiten wissenschaftlichen Diskurs zugeführt werden können.

Für den Inhalt der Beiträge sind die Autoren verantwortlich. Eine Haftungsübernahme durch die Redaktion erfolgt nicht.

Mit der Einsendung von Manuskripten geben die Verfasser ihre Einwilligung zur Veröffentlichung. Die von den Autoren zu beachtenden Richtlinien zur Einreichung der Beiträge sind unter www.vti.bund.de oder bei der Geschäftsführung erhältlich. Das exklusive Urheber- und Verwertungsrecht für angenommene Manuskripte liegt beim vTI. Es darf kein Teil des Inhalts ohne schriftliche Genehmigung der Geschäftsführung in irgendeiner Form vervielfältigt oder verbreitet werden.

Herausgeber

Johann Heinrich von Thünen-Institut (vTI)

Gutachtergremium

Siehe 3. Umschlagseite

Schriftleitung

Prof. Dr. Folkhard Isermeyer

Geschäftsführung

Dr. Matthias Rütze
Tel. 040 - 739 62 - 247
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg, Germany
landbauforschung@vti.bund.de
www.vti.bund.de

ISSN 0458-6859

Alle Rechte vorbehalten.

vTI Agriculture and Forestry Research

Landbauforschung (vTI Agriculture and Forestry Research) is the scientific journal of the Johann Heinrich von Thünen Institute (vTI), Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries. The journal is published quarterly by the vTI. Special issues are published additionally.

The journal publishes research results under the auspices of the German Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV). Articles bear relevance to agriculture and forestry, as well as to rural areas, and include reports on cooperative projects involving the vTI.

vTI Agriculture and Forestry Research is a multidisciplinary journal, encompassing the various facets of this field of research and placing a particular emphasis on interdisciplinary linkages.

English language contributions are desired so that the research results can achieve as broad a scientific discourse as possible.

The authors are responsible for the content of their papers. The publishers cannot assume responsibility for the accuracy of articles published.

With the submission of a manuscript, the author grants his or her permission for publication. Authors are requested to follow the guidelines for submission found at www.vti.bund.de or available from the management.

The vTI retains exclusive copy and usage rights for accepted manuscripts. No portion of the content may be duplicated or distributed in any form without the written permission of the publisher.

Publisher

Johann Heinrich von Thünen Institute (vTI)

Editorial Board

Directors of vTI-Institutes

Editor in Chief

Prof. Dr. Folkhard Isermeyer

Managing Editor

Dr. Matthias Rütze
Phone + 49 - 40 - 739 62 - 247
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg, Germany
landbauforschung@vti.bund.de
www.vti.bund.de

ISSN 0458 – 6859

All rights reserved.

Klaus Walter

Fütterung und Haltung von Hochleistungskühen

1. Rationsoptimierung, Nährstoffdefizit und -bedarf

The feeding and husbandry of high performance cows

- 1 1. Optimization of rations, nutrient deficits and standard requirements

Traute-Heidi Anderson

Assessment of DNA contents of soil fungi

- 19 Bewertung der DNA-Gehalte von Bodenpilzen

Claus Deblitz, Julia Brömmmer and Daniel Brüggemann

Beef production in Germany - production systems and their spatial distribution

- 29 Rindfleischproduktion in Deutschland - Produktionssysteme und räumliche Verteilung

Bernhard Osterburg und Thomas Schmidt

Weiterentwicklung der Berechnung regionaler Stickstoffbilanzen am Beispiel Niedersachsen

- 45 Improved methods for calculating regional nitrogen balances using Lower Saxony as an example

Karen Aulrich and Kerstin Barth

Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats

- 59 Euterinfektionen durch koagulase-negative Staphylokokken und ihre Auswirkungen auf die Zellzahl von Ziegenmilch

Kerstin Barth, Elke Burow and Karin Knappstein

EC and CMT detect subclinical mastitis in dairy sheep but less sensitive than in dairy cows

- 65 Auch bei Schafen kann man mit der elektrischen Leitfähigkeit und dem Schalmtest subklinische Mastitis erkennen - jedoch weniger genau als bei Kühen

Gerold Rahmann, Karen Aulrich, Kerstin Barth, Herwart Böhm, Regine Koopmann, Rainer Oppermann, Hans Marten Paulsen und Friedrich Weißmann

Klimarelevanz des Ökologischen Landbaus - Stand des Wissens

- 71 Impact of organic farming on global warming - recent scientific knowledge

Rüdiger Hell and Helke Hillebrand

Evaluation of future developments in agrobiotechnology: The potential roles of protein nitrogen and sulfur for better crop plants

- 91 Bewertung zukünftiger Entwicklungen in der Agrarbiotechnologie: Das Potential von Stickstoff und Schwefel in Proteinen zur Verbesserung von Nahrungspflanzen

Gihan M. Hussein, Ismail Ahmed Ismail, Mahmoud El Saied Hashem, Salah Mahmoud El Miniawy and Naglaa A. Abdallah

In vitro regeneration of gerbera

- 97 *In vitro* Regeneration von Gerbera

Ghada A. Abu-El-Heba, Gihan M. Hussein and Naglaa A. Abdalla

A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system

- 103 Ein schnelles und effizientes System zur Regeneration und Transformation von Tomaten

Nahed Abdel Ghaffar Abdel Aziz Ibrahim, Sanaa Osman Abdallah, Mohamed Sayed Salama and Magdy Ahmed Madkour

Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*

- 111 Herstellung eines Stammes von *Bacillus thuringiensis* wirksam gegen *Spodoptera littoralis*

Sami S. Adawy, Mahmoud M. Saker, Wafaa M. Haggag and Haniya A. El-Itriby

Amplified Fragment Length Polymorphism (ALFP) based molecular analysis of Egyptian barley lines and landraces differing in their resistance and susceptibility to leaf rust and net blotch diseases

- 125 ALFP basierte Molekularanalyse der Resistenz ägyptischer Gersten-Linien und -Landrassen gegen Blattrost und Netzfleckenkrankheit

Salah Sayed Ahmed, Soaad Esmaeil Essawy El-Gengaihi, Mohamed El-Sayed Ibrahim and Ewald Schnug

Preliminary phytochemical and propagation trial with *Salvadora persica* L.

- 135 Untersuchungen zur Phytochemie und Vermehrung des Zahnbürstenbaums (*Salvadora persica* L.)

Dirk Selmar

Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants

- 139 Steigerung des Gehaltes an Sekundärstoffwechselprodukten in Gewürz- und Arzneipflanzen durch Salz- und Trockenstress

Fütterung und Haltung von Hochleistungskühen

1. Rationsoptimierung, Nährstoffdefizit und -bedarf

Klaus Walter*

Zusammenfassung

Die Wirtschaftlichkeit der Milchproduktion ist auch in Zukunft nur durch steigende Milchleistungen zu sichern.

Hochleistungskühe nehmen im ersten Drittel der Laktation erhebliche Energie- und Nährstoffdefizite hin, die innerhalb der Zwischenkalbezeit ausgeglichen werden müssen. Da zunächst zuwenig gefüttert werden kann und anschließend mehr gefüttert werden soll als für die aktuelle Leistung benötigt, erweist sich die leistungsgerechte Rationsbemessung für Hochleistungskühe als wenig geeignet und ist durch ein Konzept zu ersetzen, das für den alle Perioden übergreifenden Ausgleich der Energie- und Nährstoffbilanz sorgt.

Da inzwischen die amerikanischen Blutlinien dominieren, ist die amerikanische Norm mit ihrem progressiv ansteigenden Energie- und Nährstoffbedarf in das Simulationsprogramm implementiert worden und steht der linearen deutschen Empfehlung bei der Rationsberechnung als Alternative gegenüber.

Das Simulationsprogramm analysiert die Frage der Effizienz des Ab- und nachträglichen Wiederaufbaus der Reserven sowie der Körpersubstanz, weil derartige Prozesse i. d. R. nicht verlustfrei verlaufen. Es wird ein Aufwandsfaktor formuliert, der sich an den Untersuchungen des NRC (2001) orientiert und den Energiebedarf zwischen 3,27 (verlustfrei) und (50 % Aufschlag) 5 MJ NEL je kg nachträglich erfüllter Milch variiert. Trotz des progressiv steigendem Energiebedarfs und eines gleichzeitig höheren Bedarfs für die zeitlich verzögerte Energie- und Nährstoffzufuhr ist eine weitere Steigerung der Leistung anzustreben.

Das neu entwickelte Simulationsprogramm stellt eine Basis für die zukünftig erforderlichen umfassenderen Planungsansätze für die Milchviehhaltung dar und ist gleichzeitig auf die immer komplexer werdenden Anforderungen der Hochleistungskühe sowie die gesamtbetrieblichen Belange ausgerichtet.

Schlüsselwörter: Energie- und Nährstoffdefizite der Hochleistungskühe, lineare und progressive Bedarfsnormen, Laktationsfunktion, zeitlich verschobene Erfüllung von Milchleistung

Summary

The feeding and husbandry of high performance cows

1. Optimization of rations, nutrient deficits and standard requirements

The economic viability of dairy production must also be secured in the future with increasing milk yields.

High performance cows suffer significant energy and nutrient deficits in the first third of the lactation period, these deficits must be balanced during the interim calving period. Since first too little feed can be fed, and subsequently more should be fed as needed for the current performance, the performance appropriate ration composition seem to be unsuited for high performance cows and must be replaced with a concept that covers all periods including the balance of energy and nutrients.

Since in the meantime American blood lines dominate, the American standards with their progressively increasing energy and nutrient needs is implemented in the simulation program and stands in contrast to the linear German recommendations in the calculation of rations as an alternative.

The simulation program analyses the question of efficiency of the use and subsequent rebuilding of reserves and bodily substance, because such processes are as a rule not without losses. A intensity factor will be formulated oriented on the studies of the NRC (2001) and the energy needs between 3.27 (loss free) and (50 % supplement) 5 MJ NEL per kg subsequently fed milk variation. Despite progressively increasing energy needs and a simultaneously higher need for time delayed energy and nutrient supplementation, a further increase in performance is to be strived for.

The newly developed simulation program provides a basis for the further requirements of extensive planning approaches for dairy husbandry to meet the at the same time increasingly complex requirements on the part of the high performance cows and the total farm needs.

Keywords: energy and nutrient deficits in high performance cows, linear and progressive requirement standards, lactation function, time delayed dairy performance feeding

* Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei (vTI), Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig/Deutschland; Email: klaus.walter@vti.bund.de

1 Einleitung und Fragestellung

Steigende Milchleistungen sichern die Gewinne aus der Milchviehhaltung, auch wenn die Milchpreise sinken und die Kosten steigen. Hohe Leistungen dagegen führen zu Nährstoffdefiziten in den ersten Tagen der Laktation (Abbildung 1) und sind als Risikofaktoren für die Leistungsbeurteilung und Gesundheit der Milchkühe anzusehen.

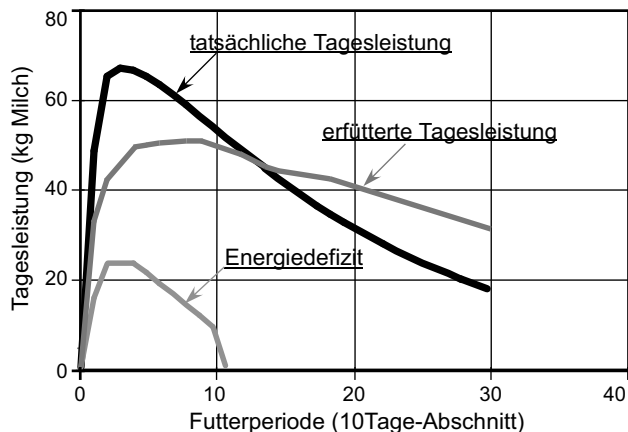


Abbildung 1:
Laktationskurve einer Kuh mit einer Milchleistung von 12.000 Litern und Nährstoffdefiziten im ersten Drittel der Laktation

Je höher das Leistungsniveau, umso mehr Milch wird aus Körperreserven und -substanz erzeugt. Diese Umwandlung von Reserven zu Milch beginnt in den ersten Tagen nach dem Abkalben und kann das erste Drittel der Laktation andauern. Dementsprechend wird diesem Zeitraum in den Fütterungsempfehlungen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Das kumulierte Energiedefizit erreicht sein Maximum, wenn die Tagesnährstoffbilanz der Kuh erstmals ausgeglichen ist. Die Hochleistungskuh befindet sich zu diesem Zeitpunkt in einer kritischen Ernährungssituation, denn die Reserven sind aufgebraucht und der Ausgleich des entstandenen Nährstoffmangels wird zwingend erforderlich. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, diese Reserven wieder aufzubauen, und die Fragestellung erweitert sich damit auch auf den Zeitraum danach. Die Fütterung im zweiten und dritten Drittel der Laktation darf wegen der negativen Energie- und Nährstoffbilanz nicht allein an der jeweiligen Tagesleistung bemessen werden, sondern sie hat die Defizite des ersten Drittels zu berücksichtigen und auszugleichen. Ab der 15. Futterperiode liegt die erfüllte Leistung deutlich über der Tagesleistung, der Ausgleich der Bilanz beginnt und dauert hier bis zum Ende der Laktation.

Die Frage des Wiederaufbaues der Körperreserven und -substanz kann nicht in den Hintergrund verdrängt oder vernachlässigt werden, sondern wird umso bedeutender, je stärker die Reserven aufgebraucht werden.

Es ist Ziel dieses Beitrags, mittels Simulationen und Optimierungskalkulationen die Grundlagen und Rahmenbedingungen der Fütterung und Haltung zu analysieren. Die Konsequenzen aus dieser Studie dienen der Entwicklung von Lösungsvorschlägen und Verfahrensalternativen, speziell für die Konzeption und Auslegung zukünftiger Futterzuertechniken. Herdenleistungen von 10.000 bis 15.000 kg Milch erfordern die konsequente Ausrichtung der Produktion auf eine tier- und leistungsorientierte Fütterung und Haltung. Diese Simulationen basieren auf gesamtbetrieblichen Kalkulationen, um umfassende, ganzheitliche Lösungen zu erzielen, sie liefern darüber hinaus die Rahmenbedingungen für zukünftige Verfahrensausformungen.

2 Literatur, Restriktionen, Modell, Daten und Vorgehen

Die Unterfütterung der Hochleistungskuh im ersten Drittel der Laktation steht seit geraumer Zeit im Zentrum des Interesses und wird als Schwerpunktthema auf vielen Tagungen (Bockisch et al., 2006; Isermeyer, 2002; Pieper, 1998 bis 2006) sowie in Veröffentlichungen (Drackley, 2005; Evans, 2003; Isermeyer, 2002; Kaske, et al., 2006; Pieper, 1998 bis 2006) behandelt. Der Ausgleich der Nährstoffdefizite findet dagegen wenig Beachtung, vielmehr wird die tierindividuelle Bewertung empfohlen, z. B. mittels „body condition score“ (bcs), um daraus Rückschlüsse für die Versorgung zu entwickeln. Diese Strategie erscheint zunächst effizient, weil damit die Konstitution des Einzeltiers erfasst und bei der Fütterung berücksichtigt werden kann. Diese Beurteilung der Kuh erweist sich jedoch als zeitaufwendig, unscharf und wenig differenziert. Sie birgt daher das Risiko der Fehleinschätzung, denn der bcs bewertet die Versorgungslage insgesamt, wenn sie sich schließlich als Körperkondition¹ manifestiert hat. Mittels der vorgegebenen Kriterien gelingt es nicht, die einzelnen Nährstoffe präzise zu bilanzieren. Nur bei einer genauen Erfassung der Nährstoffaufnahme und des Erhaltungs- zuzüglich Leistungsbedarfs sind die Defizite und deren Ausgleich kalkulierbar. Der einzelne Fütterungsabschnitt darf nicht mehr allein gesehen werden, sondern alle vorhergehenden und zukünftigen Abschnitte sind simultan zu betrachten. Um derartige Defizit- und Überschussphasen sicher erfassen und berechnen zu können, ist neben der laufenden Bilanzierung die gesamte Zwischenkalbezeit zu kalkulieren.

Für die Fütterung und damit auch für die vorzunehmenden Modellkalkulationen stellt sich die Frage nach dem Aufwandsfaktor bzw. nach den Verlusten, die durch den

¹ Die tierspezifische Vorgeschichte und die genetische Veranlagung sind zusätzlich zu beachten, denn die Kriterien des bcs stellen nur allgemein gehaltene Regeln dar (NRC, 2001, Figure 2-2).

Abbau der Körperreserven und dem zeitverschobenen Wiederaufbau entstehen. In der jüngeren deutschsprachigen Literatur finden sich keine quantitativen Informationen über den Aufwandsfaktor, so dass auf frühere Arbeiten (Rohr, 1972; Walter, 1976) zurückgegriffen wird. Aus Angaben des National Research Council, Subcommittee on Animal Nutrition, Nutrition Requirements of Dairy Cattle, table 2.5 (NRC, 2001), kann ein Aufwandsfaktor abgeleitet werden. Da diese Angaben zu unterschiedlichen Relationen führen (Walter, 2007), wird mit gestaffelter Effizienz simuliert.

Die Ergebnisse der jüngsten Arbeiten (Bockisch et al., 2006; Drackley, 2005; Evans, 2003; Kaske et al., 2006) verdeutlichen, dass eine Trockenphase mit üppiger Fütterung dem Leistungsniveau der folgenden Laktationsperiode abträglich ist und sowohl die Futteraufnahme als auch das Leistungsniveau beeinträchtigen. Das begrenzt den verfügbaren Zeitraum zum Ausgleich von Nährstoffdefiziten auf die Laktationsperiode und schließt die Trockenstehphase aus, obwohl sich gerade dieser Zeitraum wegen des allein auf Erhaltung und Reproduktion reduzierten Nährstoffbedarfs besonders eignete.

Herkömmliche Ansätze zur Rationsberechnung betrachten stets nur einen Fütterungsabschnitt, eine Kuh und ein Leistungsniveau. Dabei wird dem Anwender ein erheblicher Spielraum zur Entwicklung einer bestmöglichen Ration gewährt. Die hier anstehende Fragestellung erfordert dagegen einen wiederholbaren, von Personen bzw. individuellen Bewertungen unabhängigen Berechnungsansatz, der zusätzlich eine Bilanzierung der Energie- und Nährstoffansprüche mehrerer Fütterungsabschnitte leisten kann. Die Lineare Programmierung (Danzig, 1963; Land, 1973) bietet sich als methodisches Instrument an, denn sie ist in der Lage mehrere Rationen simultan zu berechnen, zudem sind die Ergebnisse wiederholbar und unabhängig von individuellen Einschätzungen und Bewertungen des Kalkulierenden.

Simulationen in Verbindung mit Optimumskalkulationen stellen effektive Alternativen zu Versuchen dar, denn sie liefern eine Vielzahl von Informationen und Erkenntnissen. Voraussetzung ist jedoch ein möglichst realitätsnahes Modell, das die biologischen Gegebenheiten und Grundsätze treffend kalkuliert, die produktionstechnischen Beziehungen und Verflechtungen korrekt abbildet und schließlich auf verlässlichen Daten basiert.

2.1 Modell

Das Modell² besteht aus zwei Komponenten, einer ge-

samtbetrieblichen Analyse inklusiv Optimierung und einem zugehörigen Simulationssystem des Komplexes Milchviehhaltung, das

- die Dauer der Zwischenkalbezeiten,
- das Leistungsniveau der Herde,
- die Anteile der Kühe in erster, zweiter und dritter Laktation,
- die jahreszeitliche Einordnung und Verteilung der Abkalbungen,
- die Dauer der Fütterungsabschnitte,
- die Auswahl der (Grund)Futterbasis,
- die Zuordnung von Sommerweidegang bzw. ganzjähriger Verfütterung von konserviertem Grundfutter zu den Fütterungsabschnitten
- und viele andere Charakteristika der Milchproduktion
- aufgabenspezifisch gestaltet und wiederholbar kalkuliert.

Für die einzelnen Fütterungsabschnitte werden der Erhaltungs- und Leistungsbedarf berechnet und an das im Modell enthaltene Rationsberechnungsprogramm übergeben. Der Erhaltungsbedarf wird nach dem Körpergewicht bemessen (das alternativ 500, 550, ... kg betragen kann) und entsprechend dem Stand der Trächtigkeit ein Energie- und Nährstoffzuschlag einkalkuliert. Weiterhin wird für die Kühe in erster Laktation ein Nährstoffbedarf für das Wachstum eingeplant (Meyer, 2005). Die Tagesleistung bzw. die mittlere Milchleistung des jeweiligen Fütterungsabschnitts berechnet das Simulationsprogramm an Hand der von (Olteanu et al., 1980) entwickelten Laktationsfunktionen.

Danach optimiert das Programm die Rationen für die einzelnen Fütterungsabschnitte, um die Lösbarkeit nachzuweisen, Defizite aufzuspüren und eventuelle Sonderfälle zu erkennen. Die erfüllten und tatsächlichen Milchleistungen sowie die benötigten Futtermengen werden summiert. Ist die Nährstoffbilanz ausgeglichen, entspricht also der Bedarf für Erhaltung und erzeugter Milchleistung dem Nährstoffangebot aus der Futteraufnahme, wird die Simulation mit dem nachfolgenden Futterabschnitt bzw. der nächsten Kuh fortgesetzt. Weist eine der Bilanzen Ungleichgewichte auf, fügt das Programm alle Fütterungsabschnitte zu einem globalen Problem zusammen, um sie simultan zu berechnen³. Dabei werden nicht mehr die Nährstoffansprüche für Erhaltung, Trächtigkeit und erzeugte Milchleistung den jeweiligen Nährstofflieferungen der einzelnen Fütterungsabschnitte gegenübergestellt, sondern alle gemeinsam zur Deckung gebracht. Die aus

² Der methodische Ansatz, das Modell, die Modellstruktur, die zu Grunde liegenden Funktionen, Algorithmen und die Realisierung sind detailliert dokumentiert (Walter, 2007).

³ Dieser Abstimmungsprozess wird mittels „Linearer Programmierung“ vorgenommen, also einem auf dem Simplexalgorithmus (Danzig, 1963) basierenden Programm (Land, 1973).

körpereigenen Reserven erzeugte Milchleistung der ersten Phase der Laktation muss dann in den später folgenden Abschnitten „erfüllt“ werden.

Abbildung 2 skizziert den Aufbau der Matrix dieses komplexen Optimierungsproblems. Durch so genannte Transferaktivitäten wird der Nährstoffbedarf für die geleistete, aber nicht erfüllte Milchmenge in den nächsten Fütterungsabschnitt übergeben. Entsteht in der folgenden Periode erneut ein Defizit, so werden diese und die bisher entstandenen Fehlbeträge addiert und erneut weiter transferiert. Dieser Prozess wird fortgesetzt, bis die Bilanz ausgeglichen ist und in den nachfolgenden Fütterungsabschnitten die Futteraufnahme ausreicht, um die entstandenen Defizite sukzessiv wieder abzubauen. Da die Trockenstehphase nicht für den Abbau der Defizite genutzt werden sollte (Drackley, 2005; Kaske et al., 2006), steht nur die Laktationszeit für den Wiederaufbau der Reserven zur Verfügung, die Günstzeit bleibt daher für den Ausgleich ausgespart. Sollte sich diese Einschränkung als zu restriktiv erweisen, kann ohne zusätzlichen Aufwand die gesamte Zwischenkalbezeit in die Bilanzierung einbezogen werden.

Durch entsprechende Vorgaben und den Rechenalgorithmus wird sichergestellt, dass alle Nährstoffansprüche erfüllt und die Alternativen vergleichbar sind. Eine für gleichzeitig alle Nährstoffe bis in die Nachkommastellen ausgeglichene Bilanz ist weder mit einem herkömmlichen noch mit dem hier gewählten Ansatz zu erreichen. Die Ursachen dafür sind vielschichtig, denn die Nährstoffansprüche der Kuh verändern sich im Betrachtungszeitraum hinsichtlich der Relationen zueinander sowie der benötigten Konzentrationen. Für diese unterschiedlichen und sich verändernden Ansprüche bieten die Futtermittel nicht die jeweils erforderlichen Mengen und Zusammensetzungen. Das Optimierungsprogramm erfüllt grundsätzlich alle Ansprüche, es muss jedoch Überschüsse zulassen. So entstehen beispielsweise unvermeidbare Eiweißüberschüsse, wenn Kühe mit geringer Leistung ausschließlich Frischgras erhalten.

Tabelle 1 zeigt die Daten der Beispielmatrix zur Optimierung einer Futterperiode. Die Zielfunktion nennt den Spaltennamen, die Preise für die Milch sowie die Futtermittel und schließlich die oberen Grenzen, also das maximale Niveau der „Aktivitäten“. Die fünfte Spalte enthält Heu bis max. 0,5 kg für Laktierende, alternativ Stroh zur beliebigen Aufnahme für Trockensteher bzw. für die „Trocken zu Stellenden“. Mit Futtergetreide und Sojaschrot werden jeweils ein Energie- und ein Eiweißträger für die Rationsgestaltung zur Verfügung gestellt. Dadurch wird sichergestellt, dass keine „einseitigen“ Engpässe bei der Energie- und Eiweißversorgung auftreten und die Rationsgestaltung eines Fütterungsabschnitts beeinträchtigt. In der vorletzten Spalte, bezeichnet als „Milchdefizit-Ausgleich“, werden alternativ ein verlustfreier Ausgleich und

zusätzlich ein um 10 % höherer Energie- und Rohproteinanspruch beim Auffüllen der Defizite dargestellt. In der letzten Spalte, ausgewiesen als „Milchdefizit-Transfer“, berechnet das Programm alternativ Folgekosten von 0 und bis zu 3 Cent je kg Milch, das als nicht erfülltes Defizit in den nächsten 10-Tages-Fütterungsabschnitt zu transferieren ist. In den nachfolgenden Kalkulationen wird alternativ mit derartigen „Straf- oder Folgekosten“ für die nachträgliche Erfüllung der Leistung gerechnet, weil einerseits Rationen für geringe Leistungen Kostenvorteile beim Ausgleich von Nährstoffdefiziten aufweisen und andererseits Risiken für die Gesundheit der Tiere entstehen, die zu vorzeitigem Abgang, zu höheren Kosten für Tierarzt und Medikamente etc. führen können.

Das Analysemodell stellt sicher, dass die Energie- und Nährstoffansprüche der gesamten Zwischenkalbezeit erfüllt werden. Bei allen Berechnungen erweist sich die Energie als knapper Faktor, daher fokussiert sich die Ergebnisdiskussion auf die Energieversorgung. Eiweiß ist trotz des Einsatzes von Silomais und der Verwendung des energiereichsten Milchviehmischfutters nicht begrenzend, so dass in einzelnen Fütterungsabschnitten und für den gesamten Betrachtungszeitraum keine Versorgungsengpässe entstehen.

Die Teilmatrizen M1 bis M36 auf der Diagonalen (Abbildung 2) enthalten die in Tabelle 1 dargestellten Daten und bilden mit den auf die jeweilige Periode bezogenen Leistungs- und Futteraufnahmedaten, den zugehörigen Zielfunktions- und Begrenzungsblöcken FP1 bis FP36 die Gesamtmatrix. Der untere Teil der Abbildung 2 enthält ein alle Abschnitte umfassendes System von Begrenzungen für einzelne Kraft- und Grundfuttermittel, Bilanzierungsgleichungen für Milchleistung, Nährstoffe und Energie. Die unterste Zeile skizziert die Bilanzierung der Energie. In diesem Beispiel fällt die 10. Fütterungsperiode noch defizitär aus, dagegen weist die 11. schon einen geringen Energieüberschuss auf. Das Optimierungsprogramm errechnet die Schwelle zur Überschusskonstellation je nach Leistungsniveau, Futteraufnahme und Futtermittelangebot, siehe dazu die Programmbeschreibung (Walter, 2007).

Für die Futteraufnahme und den Verlauf der Milchleistung liegen nur wenige Schätzfunktionen vor. Daher werden die von Olteanu et al. (1980) und vom National Research Council (2001, Figure 1.2) entwickelten Laktationsfunktionen adaptiert. Der Vergleich mit Daten zur Futteraufnahme aus Versuchen (Meinhold et al., 1976; Rohr, 1972; Walter, 1976; Walter et al., 2005; Veerkamp, 1999) zeigt eine deutliche Übereinstimmung für Niveau und Verlauf der Kurven mit denen des National Research Council (NRC, 2001, Figure 1.2). Betriebliche Angaben (Rinderspezialberatung 2003; Walter et al., 1998) zu Rationsberechnungen, zur Futtermengenerfassung und zu Futterresten liefern eine ausgewogene Bilanz von Erzeugung und Ver-

Tabelle 1:

Vereinfachte Matrix einer einzelnen Futterperiode

Zielfunktion der Futterperiode											
Milch	Grassilage 1.Schnitt	Grassilage 2.Schnitt	Maisilage	Stroh Heu	Futter- getreide	Milchvieh- mischfutter	Soja- schrot	Vit. Min.	Rohfaser (min - %)	Milch- defizit	Milchdef. Ausgleich
25	-2	-3	-2	-1/3	-15	14	-21	-25	0	0	25
frei	30	30	30	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei

-3,2	2,5	2,5	2	2	7,5	7,2	7,5	0	0	0	0/-0,32
-50	67	67	30	30	80	175	425	0	0	0	0/-5
0	0,45	0,45	0,32	0,86	0,86	0,88	0,88	0,88	0	0	0
0	0,45	0,45	0,32	0,86	0	0	0	0	0	0	0
0	0,1	0,1	0,08	0,45	0,01	0	0	0	0	0	0
0	0,45	0,45	0,32	0,86	0,86	0,88	0,88	0,88	-1	0	0
0	0,1	0,1	0,08	0,45	0,01	0	0	0	-0,175	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1

>=	40	(MJ)	NEL
>=	636	(g)	Rohprotein
<=	17	(kg)	TS
<=	12	(kg)	TS-GF
>=	4	(kg)	Rohfaser
>=	0	(kg)	TS
<=	0	(%)	Rohfaser %
=	35	(kg)	Milch
=	0	(kg)	Milchtransfer

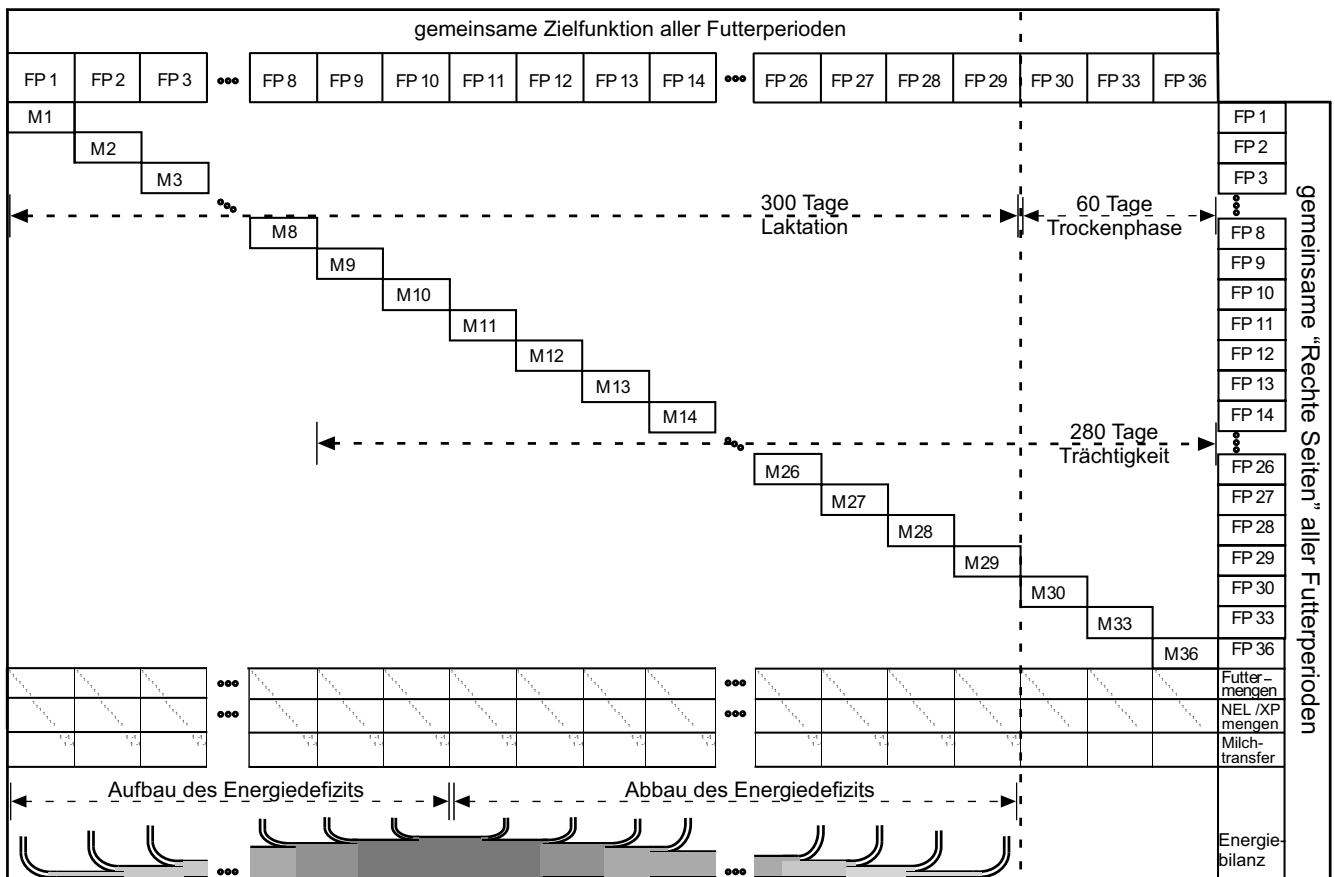


Abbildung 2:

Struktur der alle Fütterungsabschnitte umfassenden Matrix und eine Skizze, die das Entstehen und den nachträglichen Ausgleich der Energiedefizite darstellt

brauch (Walter et al., 1998; Walter et al., 2005), wenn mittels der hier zu Grunde gelegten Leistungs- und Futteraufnahmefunktionen die betriebliche Futtersituation geprüft wird.

Das National Research Council (2001) nennt allein die Futteraufnahme und unterscheidet keine Grund- und Kraftfutteraufnahme. Diese in Tabelle 1 dargestellte Verfeinerung des Modells kommt nicht zur Anwendung, wenn

die „amerikanischen Konditionen“ analysiert werden.

Der Energie- und Eiweißbedarf wird entsprechend der Futterbewertung und den Fütterungsnormen der DLG berechnet (DLG, 1991; Meyer, 2005). Die Fütterungsempfehlungen der DLG basieren auf linearen Aufwands- und Ertragsrelationen, amerikanische Normen erscheinen auf den ersten Blick ähnlich, beinhalten dagegen eine Degression der Energieeffizienz⁴ bei steigenden Futteraufnahmen (NRC 2001; Robinson 2006) und entsprechen dem „Gesetz vom abnehmenden Ertragszuwachs“. Weil mittlerweile in den meisten norddeutschen Milchviehbeständen die amerikanischen Blutlinien dominieren, wird in Anlehnung an amerikanische Bedarfswerte zusätzlich mit dem „Energy Discount“ nach Robinson (2006) und Durbal (2001), also einer Progression des Energiebedarfs, kalkuliert. Um diesen unterschiedlichen Systemen und den zu erwartenden strukturellen Konsequenzen gerecht zu werden, wird alternativ mit linearen und progressiv bzw. stark progressiv steigenden Energiebedarfswerten gerechnet.

Die amerikanischen Normen lassen sich nicht direkt übernehmen, weil sowohl die Futterbewertung als auch die Bedarfsnormen auf unterschiedlichen methodischen Konzepten basieren. Daher wird die Progression an Hand der Tabellenwerke (Robinson, 2006; NRC, 2001) und der explizit genannten Funktionen (Durbal, 2001) geschätzt. Die Variante „progressiv“ stellt eine günstige⁵, die Variante „stark progressiv“ dagegen eine pessimistische Interpretation der amerikanischen Empfehlungen dar. Ein allgemein nutzbares auf den amerikanischen Normen basierendes Excelspreadsheet der Universität von Illinois (Robinson, 2006) stützt die entwickelten Alternativen (Walter, 2007).

Das hier anstehende Problem der Energie- und Nährstoffdefizite bei höchsten Leistungen entsteht unabhängig vom Bewertungssystem und bestimmt in den Hochleistungsherden die Fütterung. Es beeinflusst damit den gesamten Komplex Futterproduktion, Jungviehaufzucht, Züchtung und die eigentliche Milchproduktion.

Der Energiebedarf für die Tagesleistungen am Beginn der Laktation übertrifft die mit dem Futter aufgenommenen Mengen erheblich. Diese Unterdeckung transferiert das Modell mittels der Aktivität Milchdefizit-Transfer (Tabelle 1) im Maßstab „kg Milch“ in die nächste Periode. Damit wird erreicht, dass bei nichtlinearen Aufwands- und Ertragsverhältnissen das jeweilige Leistungsniveau und damit der Energiebedarf der „erfütternden“ und nicht der defizitären Periode kalkuliert wird. Die Aktivität Milchdefizit-Ausgleich nimmt diese Defizite auf, wenn das Nährstoffangebot in der aufgenommenen Futtermenge den Erhaltungs- und Leistungsbedarf der Periode übertreffen kann.

Höchste Leistungen sind nicht zu erfüttern, weil die Kuh nach dem Kalben die erforderliche Futteraufnahme nicht erreicht. Daher mobilisiert die Kuh die defizitären Energie- und Nährstoffmengen aus der Reserve und Körpersubstanz, die dann nachträglich, also zeitlich verzögert, wieder aufzufüllen sind. Da dieser Ab- und Wiederaufbau von Körpersubstanz nicht verlustfrei erfolgt (Rohr, 1972; NRC, 2001; Walter, 2007), muss ein höherer Bedarf für den Wiederaufbau vorgesehen werden. Über das Ausmaß dieser Verluste liegen die Schätzungen des NRC (2001, table 2-5) vor, die je nach Lebendgewicht und body condition score unterschiedlich ausfallen, so dass mit Verlustraten zwischen 0 bis 50 % gerechnet wird (Walter, 2007). Da zusätzlich der lineare und progressiv ansteigende Nährstoffbedarf bewertet wird und gleichzeitig für den Wiederaufbau mehrere Varianten unterstellt werden, ergeben sich eine Vielzahl von Alternativen. Diesen Konstellationen stehen wiederum Kühe verschiedenen Alters mit unterschiedlichen Leistungen, Laktaktionsverläufen, Zwischenkalbezeiten etc. gegenüber, die ebenfalls zu evaluieren sind.

Spezielle Fragen zu Feinheiten der Fütterung, wie „geschütztes Eiweiß“, Fettbeimischung, optimale Mineralstoff- und Vitaminergänzung etc. bleiben bei diesen Kalkulationen ebenso ausgeklammert wie die Bewertung der Futtergewinnung, -lagerung und -vorlage, die Zahl der Melk- und Fütterungszeiten, die Gruppenbildung und andere Verfahrens- und Haltungskonzepte. Es wird für die gesamte Zwischenkalbezeit konserviertes Grundfutter vorgesehen. Um sicher zu sein, dass keine Widersprüche mit den im Folgenden ausgewiesenen Ergebnissen auftreten, sind Sommerweidegang bzw. Frischgrasversorgung im Stall ebenfalls kalkuliert worden. Die große Zahl von Kennzahlen und ihre Bedeutung für das Verfahren Milchproduktion finden jedoch nur am Rande Erwähnung, weil sie eine Vielzahl von zusätzlichen Effekten beinhalten, die die Ergebnisinterpretation sowie -darstellung sehr komplex gestalten und erschweren.

2.2 Restriktionen

Für die Rationsgestaltung gelten hier die folgenden Regeln:

- Die Trockenstehphase⁶ dient nicht der Wiederauffüllung der Körperreserven.
- Der Rohfasergehalt beträgt mindestens 17,5 % (diese Begrenzung wirkt sehr restriktiv, denn nur bei sehr hohen Grundfutteraufnahmen kann die Ration viel Kraftfutter enthalten).

⁴ Robinson (2006) und Durbal (Autor des Rationsberechnungsprogramms des NRC, 2001) verwenden den Ausdruck „energy discount“.

⁵ Ein geringer Bedarf wird als günstig angesehen.

⁶ Das Modell kann alternativ die Trockenstehphase in den Zeitraum zur Wiederauffüllung der Reserven einbeziehen.

- Das Grundfutter steht ausreichend zur Verfügung.
- Die errechneten Futtermengen werden auch tatsächlich aufgenommen.
- Eine an die Leistung und das Grund- sowie Kraftfutter angepasste Vitamin- plus Mineralstoffgabe ist unerlässlich.

Zusätzlich wird unterstellt, dass keine Krankheiten auftreten, die Kühe eine Zwischenkalbezeit von genau 360 Tage erreichen, eine Tragzeit von 280 Tagen aufweisen, 80 Tage nach dem Kalben wieder trächtig werden und keine anderen Effekte die Milchproduktion beeinträchtigen.

Die Ergebnisse beruhen hier nur auf Berechnungen für Kühe in der zweiten Laktation. Der zusätzliche Energie- und Nährstoffbedarf für das Wachstum der jungen Kühe in Verbindung mit einer geringeren Futteraufnahme vergrößert die Defizite und reduziert den Spielraum für die zeitlich verschobene Erfütterung der Milchleistung. Da Erstlaktierende von den hier diskutierten Problemen noch stärker betroffen sind, sollte ihnen dementsprechend mehr Aufmerksamkeit⁷ zukommen.

Gras- und Maissilage bilden die Grundfutterbasis⁸, Heu ist in geringen Mengen zugelassen, um die Rohfaserversorgung zu sichern. Während der Güstzeit wird statt Heu das kostengünstigere Stroh eingesetzt. Nebenprodukte aus der Nahrungsmittelindustrie bleiben unberücksichtigt. Sommerweidegang brächte mit seinen der Vegetation angepassten unterschiedlichen Futterqualitäten zusätzliche Effekte für das Entstehen und den Abbau der Defizite. Die daraus resultierenden Ergebnisse fielen komplexer aus, lieferten jedoch keinen zusätzlichen Beitrag für die Lösung der anstehenden Fragen.

Die strukturellen Unterschiede und die Tendenzen zeigen sich deutlicher und klarer, werden im ersten Schritt möglichst wenige Randeffekte zugelassen. Das hat zwar eine gewisse „Praxisferne“ zur Folge, bringt aber dafür mehr Transparenz. Um sicher zu stellen, dass die vorgestellten Ergebnisse auch bei komplexeren Ansätzen ihre Gültigkeit behalten, werden zusätzliche Simulationen mit den soeben genannten umfassenderen Strukturen durchgeführt. Die Entwicklung von Ansätzen zur Minderung der Defizite bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

Die Vorgaben sind sehr restriktiv formuliert, um die Ergebnisse der Modellkalkulationen vergleichbar zu gestalten. Die Bedeutung der großen Streuung der tierindividuellen Leistungsparameter, der Grundfutterqualitäten und der Verfahrensausformungen für die Leistungssteigerung sind ebenfalls kalkuliert worden. Die zugehörigen Resulta-

te stehen im Einklang mit den nachfolgenden Ausführungen, werden aber nicht explizit erwähnt.

Das Modell enthält eine Reihe von Plausibilitätstests, die nicht nur die Ablauffähigkeit sichern, sondern auch eine Reihe von Testdaten liefern, die durch einen Vergleich mit Versuchsergebnissen und betrieblichen Kennzahlen die Realitätsnähe gewährleisten (Walter, 2007).

Grundsätzlich bietet ein solches Modell die Möglichkeit eine Vielzahl von Einschränkungen, Vorgaben und Bedingungen zu berücksichtigen und zu variieren, um deren Bedeutung zu quantifizieren. Damit können die Folgen bewertet und an deren Auflösung geforscht werden. Andererseits lassen sich neue und vom Stand des Wissens abweichende Gewichtungen ableiten, die bei der Weiterentwicklung der Milchproduktion eingesetzt werden können, um die effektivsten Parameter zu finden und zu optimieren.

2.3 Daten

Das Modell und die mathematischen Algorithmen bilden den funktionalen Teil des Simulationsprogramms. Die Daten aus Milchvieh haltenden Betrieben mit Hochleistungsherden (Rinderspezialberatung, 2003; Walter et al., 1998; Walter et al., 2005) und aus wissenschaftlichen Experimenten (NRC, 2001; Veerkamp, 1999) stellen die notwendige Ergänzung dar, um die Konzepte für eine zukünftige Milchproduktion entwickeln zu können.

Die Preise für die Grundfuttermittel orientieren sich an norddeutschen Verhältnissen und basieren auf Kostenkalkulationen des „Arbeitskreis Forschung und Praxis der FAL“ (Walter et al., 1998), der Landwirtschaftskammer Kiel (Rinderspezialberatung, 2003) und den Berechnungen von Helmers (2005). Die nachfolgenden Ergebnisse sind relativ stabil gegen Preisverschiebungen zwischen Gras- und Maissilage sowie Grund- und Kraftfutter. Weit- aus empfindlicher reagiert das Simulationssystem auf Veränderungen der naturalen Kennziffern, wie beispielsweise auf die Nährstoffkonzentration in den Futtermitteln, die Futteraufnahme, den Mindestrohfasergehalt etc.

2.4 Vorgehen

Zunächst werden die Daten für die genannten Alternativen modelliert und die Ergebnisse vergleichend gegenübergestellt. Die Simulation dient der Exploration von Strukturen und Beziehungen. Da die Alternativen auf zukünftige betriebliche Konstellationen ausgerichtet sind und das zur Diskussion gestellte Leistungsniveau bisher nur in Ausnahmefällen erreicht wird, sollen im Folgenden weniger die „Stellen hinter dem Komma“ als vielmehr die Relationen, Strukturen und Tendenzen vorgestellt und diskutiert werden.

⁷ In nachfolgenden Arbeiten werden diese Probleme detailliert kalkuliert und spezielle Lösungsvorschläge entwickelt.

⁸ Die Ergebnisse fallen bei einer abweichenden Grundfutterversorgung nicht grundlegend anders aus.

Das Simulationsprogramm maximiert zunächst die Differenz zwischen den Einnahmen aus der Milch und den Futterkosten unter den Nebenbedingungen, dass die vorgegebenen Grenzen der Futteraufnahme, der Mindestgehalte an Energie, Rohprotein, sowie Rohfaser eingehalten werden. Der zur Optimierung genutzte Simplexalgorithmus (Danzig, 1963) stellt sicher, dass sowohl für die einzelnen Fütterungsabschnitte als auch für die gesamte Zwischenkalbezeit alle Bedingungen eingehalten werden. Im Einzelnen sucht und findet das Modell die kostengünstigste Fütterung und gleichzeitig die höchste Leistung für die Gesamtperiode. Damit verbunden ist die offene Frage nach den Folgen der im ersten Drittel der Laktation auftretenden Nährstoffdefizite, der Belastung durch Ausmaß und Dauer der defizitären Nährstoffbilanz sowie nach dem zulässigen maximalen Niveau des Defizits. Darüber hinaus fehlt eine physiologische Bewertung des maximal zulässigen Nährstoffdefizits und der zeitlich verschobenen Zuführung von Nährstoffen. Dazu stellt die Literatur keine quantitativen Angaben zur Verfügung, so dass erneut Annahmen zu treffen sind. Hier wird zunächst das höchste tägliche sowie das insgesamt auftretende Defizit ermittelt und diskutiert. In erster Annäherung geht das Simulationsprogramm von einem verlustfreien zeitlich verschobenen Wiederaufbau der Körpersubstanz und Reserven aus und verlangt damit von der Hochleistungskuh Ab- und Aufbauprozesse in erheblichem Umfang. Da diese Annahme unrealistisch ist (NRC, 2001), werden Folgekosten und maximal zulässige Defizite in die Kalkulationen einbezogen und kalkuliert. Zwar liegen eine Vielzahl von Hinweisen vor, aber es gibt keine quantitativen Analysen, die Auskunft über die Belastungen und deren Folgen für Gesundheit und Leistungsvermögen geben. Daher bietet sich an, diese Kosten mittels Alternativkalkulationen anzurechnen und deren Bedeutung für die Milchproduktion zu schätzen. Entstünden nämlich fühlbare Einbußen, so minderte es die maximal erzielbare Leistung oder wirkte sich wie im Falle von Folgekosten negativ auf die Effizienz der Ab- und Aufbauprozesse aus.

Über die Verluste bzw. den Aufwandsfaktor derartiger Ab- und Aufbauprozesse von Reserven und Körpersubstanz liegen u. a. die Angaben des NRC (2001) zur Energiefreisetzung durch Körpersubstanzabbau und des Energiebedarfes bei Körpersubstanzaufbau vor. Diese stehen in enger funktionaler Beziehung „body condition score“ und bieten die Grundlage für die Bewertung der Effizienz dieses Prozesses. Diese unterscheiden sich nach Lebendgewicht, Körperzustand etc. und lassen sich nicht zu einem definierten Faktor „verdichten“. Das Simulationsprogramm adaptiert diese Werte, um die Bedeutung der „neuen“ Aufwands- und Ertragsrelation zu evaluieren.

3 Ergebnisse

Zunächst bestimmt das Simulationsprogramm das Niveau der Defizite bei steigenden Leistungen. Deren Ausmaß erreicht mehr als 10 % der Jahresleistung und zwingt zur Berücksichtigung von Folgekosten. Im nächsten Schritt werden die linearen und progressiv steigenden Aufwands- und Ertragsrelationen untersucht und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Fütterungsempfehlungen sowie die tierspezifischen Verläufe der Laktationsfunktionen in die Simulation einbezogen.

3.1 Energie- und Nährstoffdefizite sowie Folgekosten

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Ergebnisse der simultanen Optimierung aller Rationen bei hohen Leistungen, wenn Nährstoffdefizite im ersten Drittel der Laktation zugelassen werden und gleichzeitig eine für den gesamten Zeitraum ausgeglichene Bilanz sichergestellt wird. Die vier untereinander angeordneten Teilgrafiken (Abbildung 3) zeigen den Verlauf der tatsächlichen Tagesleistung (Laktationsfunktion), die erfütterbare tägliche Leistung und das Energiedefizit im Maßstab „kg Milch“ für die Jahresleistungen 7.500, 10.000, 12.500 und 15.000 kg Milch. Das maximale tägliche Energiedefizit für diese vier Leistungen beläuft sich auf 12, 17, 23 und 28 kg Milch je Tag. Die zeitlich verschobene, zu erfütternde Milchmenge erreicht in diesen Beispielen 950, 1.560, 2.100 und 2.600 kg Milch für die vier Alternativen, entsprechend jeweils 12,6, 15,6, 16,8 und 17,3 % der produzierten Jahresleistung. Mit dem Niveau der Leistung nehmen auch die Dauer und das Ausmaß der Unterfütterung zu (Abbildung 3). Energie- und Nährstoffdefizite beschränken sich nicht auf hohe Leistungen, sondern treten in geringerem Ausmaß auch bei den herkömmlichen Leistungen auf.

Das hier diskutierte Problem ist nicht neu, denn 10.000 kg stellten vor ca. 20 Jahren und 7.500 kg vor 30 bis 40 Jahren eine Spitzenleistung dar. Da die Energie- und Nährstoffkonzentrationen in den Futtermitteln zu dieser Zeit deutlich geringer ausfielen, mussten die Spitzenkühe auch damals schon mit erheblichen Defiziten „durchkommen“ (Walter, 1976).

Bei den geringeren Leistungen fallen sowohl die defizitäre Phase, als auch der erforderliche Zeitraum zum Ausgleich der Bilanz vergleichsweise kurz aus. Die negativen Energie- und Nährstoffbilanzen der Hochleistungstiere dauern dagegen bis zu 130 Tagen an, der Ausgleich erfordert in etwa den gleichen Zeitraum, so dass diese Tiere während der gesamten Laktation ein deutliches Ungleichgewicht zwischen Bedarf und Versorgung aufweisen.

Die in Abbildung 3 dargestellten Verläufe der tatsächlichen und erfütterten Leistung basieren auf Kalkulationen mit Folgekosten in Höhe von 2 Cent für jedes kg Milch,

das zeitlich verschoben erfüllt werden muss. Abbildung 4 zeigt dagegen das Ergebnis der Berechnungen für unterschiedlich hohe Folgekosten und einer einheitlichen Jahresleistung von 12.500 kg Milch.

Die Belastung der „nicht erfüllten Leistung“ mit Folgekosten geschieht, um den physiologischen Belastungen der Kuh Rechnung zu tragen, um ein Verschieben des Bilanzausgleichs in die letzten Fütterungsperioden und um die damit verbundenen lang anhaltenden Ungleichgewichte zu verhindern. Die Grenzkosten des „Erfüllens“ eines zusätzlichen kg Milch fallen im letzten Drittel der Laktation am Geringsten aus. Das Bilanzierungsmodell optimiert die Differenz zwischen Milcherlös und Futterkosten und verlagert dementsprechend den Ausgleich der Defizite in die Perioden mit den geringsten Futterkosten je Produkteinheit, also die letzten Fütterungsabschnitte der Laktation. Das führt bei Folgekosten von 0 Cent zu dem in Abbildung 4 dargestellten Bilanzausgleich in der 24. bis 30. Fütterungsperiode. Werden jedoch Folgekosten von 1 bzw. 3 Cent für jedes kg Milch angerechnet, das einen Monat verschoben zu erfüllen ist, geht der Kostenvorteil der letzten Fütterungsperioden verloren und der Abbau der Defizite beginnt ab der 13. Fütterungsperiode. Die energetische Tagesbilanz ist in der 12. Periode erstmals ausgeglichen, so dass der Wiederaufbau der Reserven und der Körpersubstanz bei weiter sinkender Tagesleistung beginnen kann. Diesen Bilanzausgleich nimmt das Simulationsmodell aber nur dann vor, wenn Folgekosten zu berücksichtigen sind, anderenfalls wird der Ausgleich in die letzten, die kostengünstigsten Fütterungsabschnitte verlagert. Die Berücksichtigung von Folgekosten dient einerseits dem Bemühen die Defizite möglichst zügig abzubauen und die Milchkuh nicht mehr und nicht länger als notwendig zu strapazieren, andererseits stellt es eine Reaktion auf die mit den Leistungen steigenden Kosten für Tierarzt und Medikamente dar (Evans, 2003; Walter, 2004).

Diese Ergebnisse verdeutlichen das Ausmaß der aus Reserven und Körpersubstanz zu aktivierenden Energie- und Nährstoffmengen, die von den Kühen zur Milchbildung ab- und später wieder aufgebaut werden müssen. In den ersten Fütterungsperioden können Hochleistungskühe offensichtlich nicht leistungsgerecht gefüttert werden, so dass es zur Unterversorgung kommt. Danach wird ein etwa gleich langer Zeitraum mit der notwendigen Überversorgung zum Ausgleich der Bilanz erforderlich, und eine auf die jeweilige Leistung abgestimmte Fütterung ist nur noch im letzten Drittel der Laktation möglich. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass für die Versorgung von Hochleistungskühen grundsätzlich neue Konzepte und Strategien zu entwickeln sind, denn eine leistungsgerechte und damit auf die Tagesleistung abgestimmte Fütterung ist nicht realistisch.

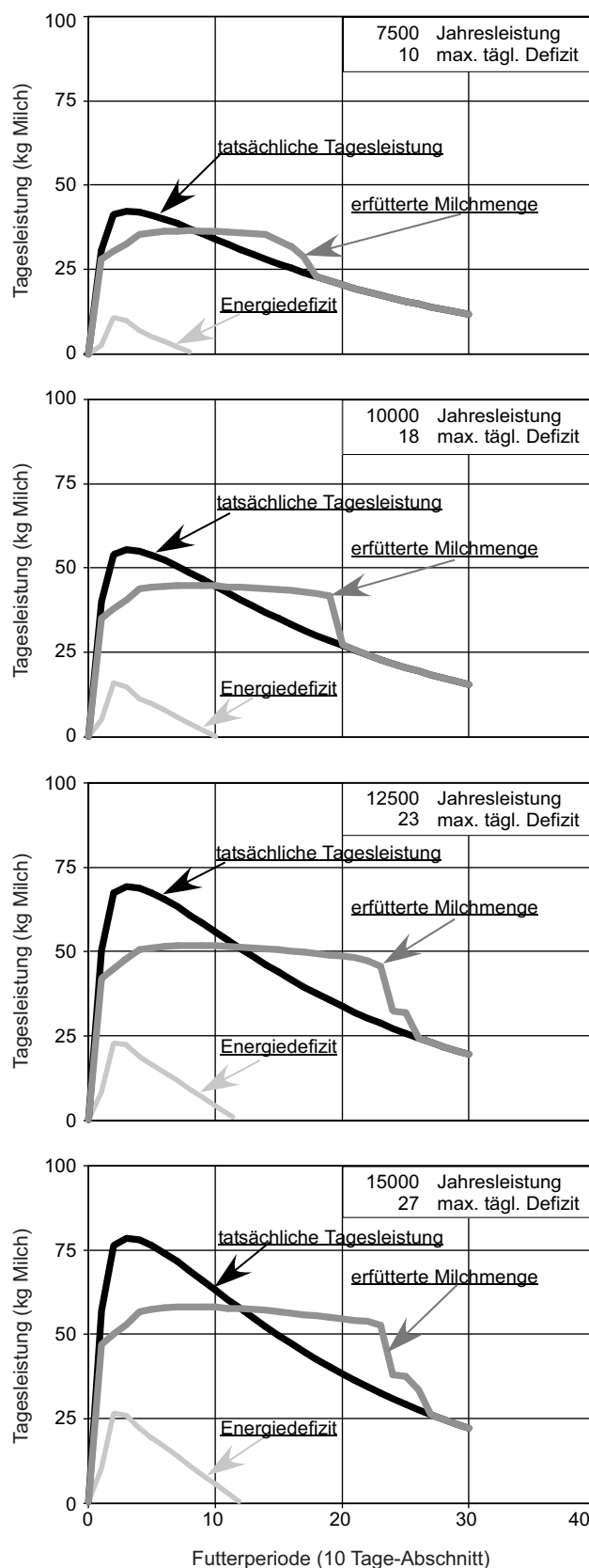


Abbildung 3:
Energiedefizit, tatsächliche und erfüllte Leistung für unterschiedliche Jahresleistungen

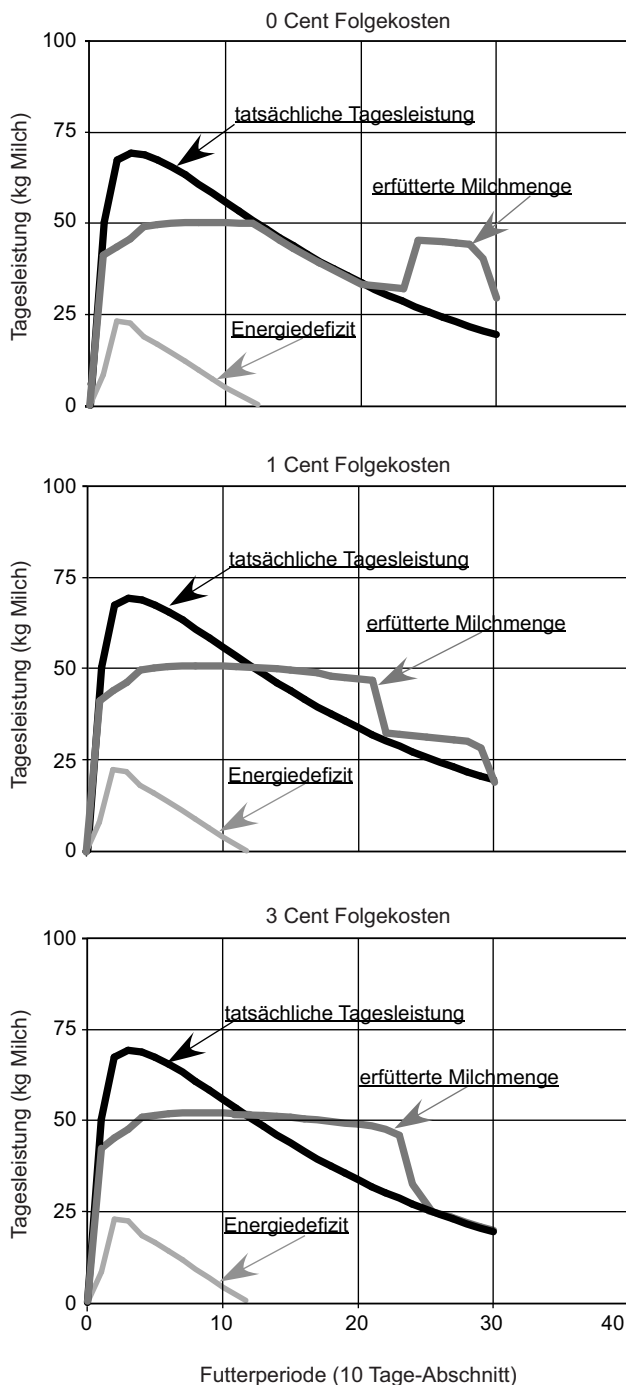


Abbildung 4:
Energiedefizit, tatsächliche und erfüllte Leistung bei unterschiedlichen Folgekosten für zeitlich verschobenen Wiederaufbau der (Körper) Reserven

3.2 Energiebedarf und Laktationsfunktionen

In Abbildung 5 werden das deutsche lineare Energiebedarfssystem und zwei Varianten mit progressiv steigendem Energieaufwand gegenübergestellt, die beide in Anlehnung an das amerikanische Berechnungskonzept (NRC, 2001; Durbal, 2001; Robinson, 2006) formuliert sind. Die

zu Grunde liegende Bewertung der Futtermittel und die zugehörigen Fütterungsempfehlungen sind jedoch nicht direkt vergleichbar und lassen sich nur schwer übertragen oder verrechnen (Walter, 2007). Daher werden eine optimistische und eine pessimistische Schätzung⁹ aus den Angaben des „Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition“ (NRC, 2001), dem zugehörigen Programm zur Rationsberechnung (Durbal, 2001), sowie aus den von Robinson (2006) vorgelegten Tabellenkalkulationsprogrammen abgeleitet. Die Abbildungen 5 und 6 stellen die drei Alternativen unter den Bezeichnungen linear (deutsche Norm), progressiv (optimistische Interpretation der amerikanischen Norm) und stark progressiv (pessimistische Interpretation der amerikanischen Norm) dar. Abbildung 5 enthält die Graphen für den reinen Leistungsbedarf je kg Milch.

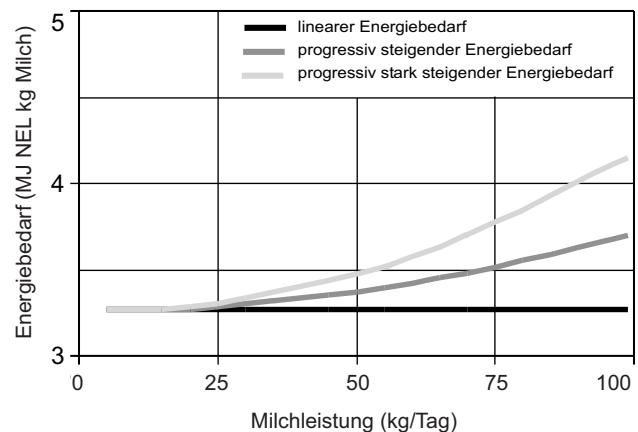


Abbildung 5:
Energiebedarf je kg Milch, lineare deutsche Norm im Vergleich zur amerikanischen Norm, die einen mit der Leistung steigenden Bedarf vorsieht

Abbildung 6 zeigt den erforderlichen Energiebedarf je kg Milch, wenn Erhaltung und Zeit des Trockenstehens beim Energiebedarf für Leistung einbezogen werden. Selbst bei extrem hohen Jahresleistungen von 15.000 bis 20.000 kg Milch ist noch eine Degression erkennbar, wenn von dem linearen bzw. progressiven Energiebedarf ausgegangen wird. Nur die Variante „stark progressiv“ weist im Bereich von 15.000 bis 17.000 kg Milch ein Minimum und darüber einen schwachen Anstieg auf. In den Spitzenbetrieben erreichen die besten Kühe Leistungen von mehr als 16.000 kg Milch¹⁰ bzw. über 1.200 kg Fett und Eiweiß (LKV Weser-Ems, 2005). Weitere Leistungssteigerungen brächten selbst für diese eher ungünstig formulierte Variante nur einen geringfügig anwachsenden Bedarf je Liter Milch. Daher wer-

⁹ Eine detaillierte Begründung und die grundlegenden Kalkulationen für die beiden Alternativen liefert die Programmbeschreibung (Walter, 2007).

¹⁰ Der LKV Weser-Ems meldet für das Kontrolljahr 2006 erstmals eine Jahresleistung von über 20.000 kg Milch (LKV Weser-Ems, 2007).

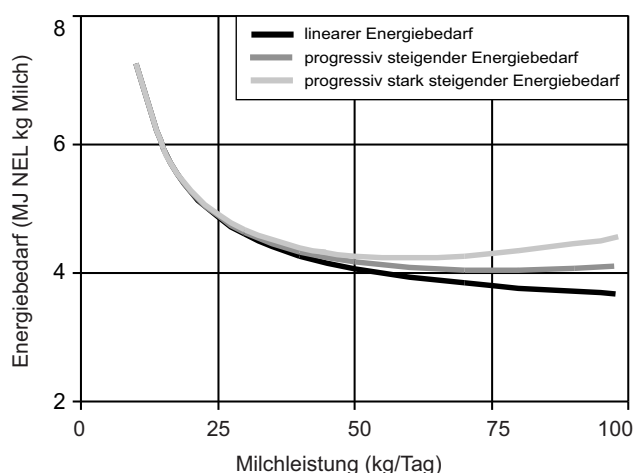


Abbildung 6:

Energiebedarf je kg Milch bei zunehmender Jahresleistung, wenn Erhaltung und Leistung sowie die Güstzeit gemeinsam kalkuliert werden, jeweils für lineare und progressive Bedarfsnormen

den die Modellkalkulationen im Folgenden auch auf diese scheinbar „utopischen“ Leistungsbereiche ausgedehnt, weil neben der hier diskutierten günstigen Aufwandsentwicklung die Degression der Kosten für den Stallplatz etc. einen kräftigen Anreiz zur Leistungssteigerung schafft.

Mit der Progression des Energiebedarfs stellt sich die Frage nach dem Verlauf der Laktationsfunktion, denn bei gleicher Jahresleistung unterscheiden sich die maximalen Tagesleistungen deutlich. Abbildung 7 zeigt vier Leistungsverläufe, die beim „Trockenstellen“ nach 300 Tagen jeweils genau 15.000 kg Milch erreichen. Während die „Kuh“ mit der sehr steilen Laktationskurve nach 50 Tagen eine Spitzenleistung von rd. 90 kg Milch pro Tag aufweist und sich damit im Bereich erheblicher zusätzlicher Energieansprüche befindet (3,62 MJ NEL bei der Variante „progressiv“ bzw. 3,93 bei der Variante „stark progressiv“, Abbildung 5), beträgt die höchste Tagesleistung der „Kuh“ mit der sehr flachen Laktationsfunktion nicht einmal 70 kg und beansprucht dementsprechend nur 3,47 bzw. 3,63 MJ NEL. Bei flacherem Verlauf der Leistungskurve fällt die Höchstleistung niedriger aus, und der Bedarf unterliegt einer weniger hohen Progression¹¹. Kühe mit geringerer Spitzenleistung und hoher Persistenz können höhere Jahresleistungen einfacher erzielen, denn sie geraten nicht so deutlich und nicht so lange in den Bereich der Progression des Energie- und Nährstoffbedarfs. Erwiesen sich die amerikanischen Ertrags- und Aufwandsrelationen auch für deutsche Verhältnisse als zutreffend, dann fiel bei gleicher Leistung der jährliche Energiebedarf für Kühe mit flacherer Laktationsfunktion niedriger aus. Sie hätten

zusätzlich den Vorteil des geringeren Defizits in den ersten 100 Tagen und beanspruchten dementsprechend eine kürzere Zeit für den Ausgleich der Bilanz. Diese Thesen lassen sich durch die Modellkalkulationen eindeutig bestätigen.

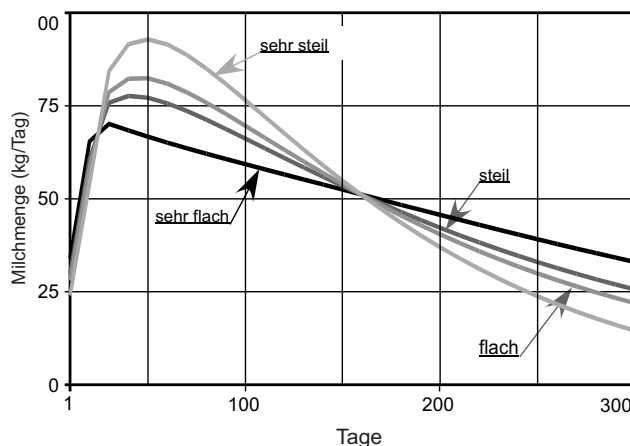


Abbildung 7:

Modellintern genutzte Laktationsfunktionen mit unterschiedlicher Persistenz

Bei einem Leistungsvergleich nach dem Selektionskriterium „100 Tageleistung“ schnitten diese Kühe dagegen um 15 - 20 % schlechter ab als diejenigen mit einem sehr steilen Verlauf der Laktation. Betriebsleiter mit Hochleistungsherden sollten ein derart kurzfristig bewertendes Kriterium zur Selektion der Tiere nur mit Vorsicht anwenden. Besser eigneten sich Maßstäbe, die neben der Jahresleistung weitere Kennzahlen berücksichtigen, wie z. B. Futteraufnahmevermögen, Ausmaß der Defizite und deren Abbau etc.

Abbildung 8 zeigt die maximal erzielbare Jahresmilchleistung für jede der vier Laktationsfunktionen, die wiederum jeweils mit den drei Energiebedarfsfunktionen (Abbildung 5) zu kombinieren und zu kalkulieren sind. Kühe mit flacher Leistungskurve und hoher Persistenz erzielen

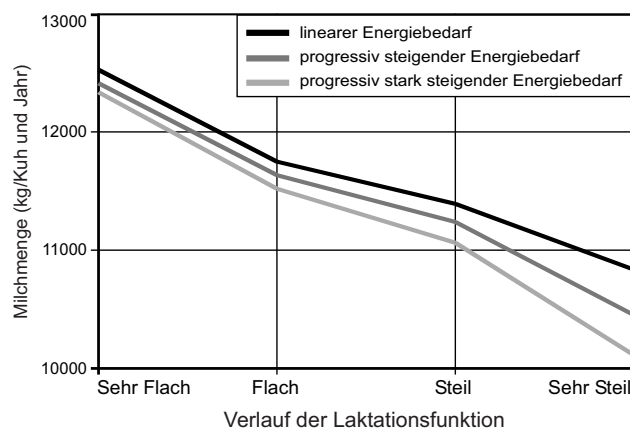


Abbildung 8:

Maximal erzielbare Milchleistung bei unterschiedlichen Energiebedarfsnormen für die vier Laktationsfunktionen aus Abbildung 7

¹¹ Es ist zu beachten, dass hier nicht der durchschnittliche, sondern der marginale Energiebedarf diskutiert wird.

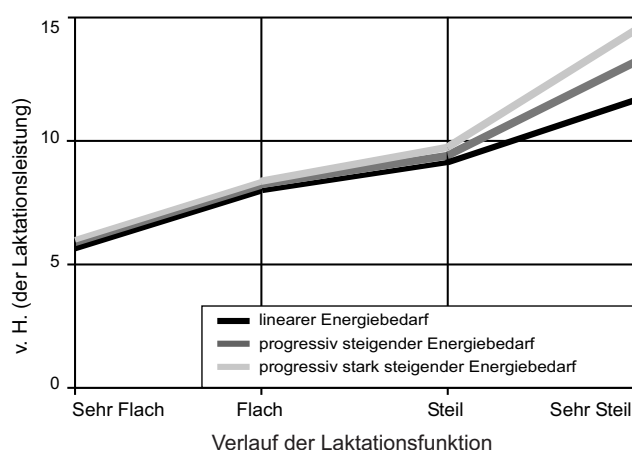


Abbildung 9:

Zeitlich verzögert erfüllte Milchleistung (in v. H. der Jahresleistung) für unterschiedliche Laktationsfunktionen und Energiebedarfsnormen

unter sonst vergleichbaren Konditionen eine um rd. 20 % höhere Leistung (Abbildung 9). Trotz der besseren Jahresleistung erleiden Kühe mit flacherem Verlauf der Tagesleistungskurve geringere Nährstoffdefizite (Abbildung 9). Diese betragen rd. 6 % von 12.500 kg Jahresleistung und entsprechen einem Defizit von rd. 750 kg Milch. Bei ungünstigem Verlauf der Laktationsfunktion, also bei steilem bzw. sehr steilem Verlauf (Abbildung 7), erreichen die maximalen Defizite je nach Energienorm 9, 12 und 15 % der Gesamtleistung, das entspricht einem Energiedefizit von ca. 1.000 bzw. 1.500 kg Milchäquivalent.

Bei den steiler ansteigenden Laktationsfunktionen wird in den Abbildungen 8 und 9 der Effekt der (stark) progressiven Bedarfsnorm deutlich. Dieser Kombinationseffekt reduziert die maximal erfüllbare Leistung und erhöht die Defizite, was wiederum die weitere Steigerung der Leistung behindert. Über die Bedeutung der tierspezifischen Unterschiede bei der Futteraufnahme, dem Lebendgewicht, der Zwischenkalbezeit etc. für die Ertrags- und Aufwandsrelationen wird in nachfolgenden Arbeiten berichtet.

Die in Abbildung 8 dargestellten maximal erzielbaren Leistungen betragen zwischen 12.500 bis 10.000 kg Milch je Kuh und Jahr und weichen damit deutlich von den in Abbildung 7 dargestellten Laktationsfunktionen für 15.000 kg ab. Die Erklärung liegt im methodischen Vorgehen, denn das Simulationsprogramm prüft, ob das vorgegebene Leistungsniveau erzielt werden kann, zunächst ohne, dann mit zeitlich verschoben erfüllter Leistung. Kommt beides nicht zu Stande, wird das angestrebte Leistungsniveau um 2,5 Promille reduziert und der Kalkulationszyklus erneut gestartet. Dieser Zyklus wird so lange durchlaufen, bis ein lösbares Ergebnis vorliegt. Diese Vorgehensweise stellt sicher, dass die höchstmögliche Jahresleistung für die jeweilige Datenkonstellation in den Vergleich einbezogen wird. Das Ausgangsleistungsniveau beträgt 15.000 kg

Milch, das jedoch mit den hier vorgegebenen (Grund)Futterqualitäten in keinem Fall „erfüllt“ werden kann. Das führt dann zu den in Abbildung 8 dargestellten maximal erzielbaren Leistungen führt.

Die Bedeutung der (Grund)Futterqualität, also der Energie- und Nährstoffkonzentration im wirtschaftseigenen Futter, wird in weiteren Arbeiten detailliert analysiert.

Wenn nicht ausdrücklich erwähnt, berücksichtigen die bisher vorgestellten Ergebnisse einen Aufwandsfaktor von 1,1 und Folgekosten von 1 Cent je kg Milchäquivalent, das zeitlich verschoben erfüllt werden muss.

3.3 Aufwandsfaktor

Das zeitlich verschobene, also nachträgliche Erfüttern von Leistung erfordert die Bereitstellung von Reserven und bei den hier angestrebten Höchstleistungen auch den Abbau von Körpersubstanz. Diese Prozesse bestimmen die defizitäre Phase der Laktation. Daran schließt sich ein Zeitraum des Wiederaufbaus der Körpersubstanz und des Auffüllens der Reserven an. Derartige Prozesse verlaufen nicht verlustfrei, daher wird die Analyse um Fragen der Effizienz dieses Geschehens erweitert. In der neueren deutschsprachigen Literatur finden sich dazu keine Angaben, so dass auf die vom NRC (2001) entwickelten Grundlagen zurückgegriffen wird.

In Tabelle 2 werden der Energiegewinn und der Energiebedarf ausgewiesen, die bei Veränderung des body condition score um jeweils einen Punkt entstehen (NRC, 2001; table 2.5). Jede Energieeinheit, die aus Körpersubstanz freigesetzt und anschließend wieder aufgebaut wird, erfordert für die in table 2.5 (NRC, 2001) genannten Rahmenbedingungen einen zwischen 17 bis 25 % höheren Energieaufwand. Auf der Grundlage dieser Beziehung kann der Aufwandsfaktor für die zeitlich verschobene Erfütterung des Energie- und Nährstoffbedarfes mit 1,17 bis 1,25 festgelegt werden. Um die tierspezifischen Unterschiede zu berücksichtigen, wird diese Spanne größer gewählt und der verlustfreien Variante¹² gegenübergestellt. Bei den folgenden Kalkulationen wird neben der verlustfreien Alternative¹³ mit einem Aufwandsfaktor von 1,1 bis 1,5 gerechnet. Beträgt der Koeffizient 1,1, dann erfordert jedes nachträglich erfüllte Kilogramm Milch einen Energiebedarf von 3,27 zuzüglich 0,327, also insgesamt 3,597 MJ NEL. Bei einem Aufwandsfaktor von 1,5 werden statt 3,27 das 1,5 fache, also 4,905 MJ NEL, angesetzt. Für den Rohproteinbedarf wird jeweils der gleiche Aufwandsfaktor unterstellt.

Die Kalkulationen erfolgen für die drei Alternativen des

¹² Die Bedarfsnormen der DLG (1991) berücksichtigen diese Sachverhalte nicht.

¹³ Das entspricht im Modell einem Aufwandsfaktor von genau 1,0.

Tabelle 2:

Energiegewinn und Energiebedarf bei Veränderung des body condition score um jeweils einen Punkt (für eine Milchkuh mit 650 kg Lebendgewicht)

Veränderung des bcs von... nach ...	Energiegewinn (MCal NEI)	Veränderung des bcs von... nach ...	Energiebedarf (MCal NEI)	Energiebedarf in v. H. des Energiegewinns für je einen bcs - Punkt
2 nach 1	375	1 nach 2	467	125
3 nach 2	399	2 nach 3	484	121
4 nach 3	417	3 nach 4	497	119
5 nach 4	432	4 nach 5	507	117

Errechnet aus NRC (2001, table 2.5)

Energiebedarfs und die vier Typen des Verlaufs der Laktation. Diese zwölf Alternativen stehen sich in Abbildung 10 gegenüber. Für jede Konstellation von Laktation und Energiebedarf wird für die verlustfreie Alternative mit einem Aufwandsfaktor von 1 bis hin zu dem hier unterstellten Aufwandsfaktor von 1,5 die Leistungseinbuße, das maximale Energiedefizit und die Summe der zeitlich verschoben erfüllten Milchmenge jeweils in v. H. der vorgegebenen Jahresleistung (12.500 kg Milch) dargestellt.

Es ist anzumerken, dass auch bei einem Aufwandsfaktor von 1,5 die Leistungssteigerung zu wachsenden Erlös - Kosten - Differenzen führt.

Durch die linke obere Teilgrafik der Abbildung 10, die den linearen Energiebedarf bei sehr flachem Verlauf der Laktationsfunktion und für unterschiedliche Aufwandsfaktoren darstellt, werden folgende Sachverhalte deutlich:

- Erst bei einem sehr ungünstigen Aufwandsfaktor entstehen geringfügige Leistungseinbußen (untere Linie).
- Das maximale Energiedefizit erreicht 7 - 8 % der Jahresleistung und nimmt mit schlechtem Aufwandsfaktor ab (mittlere Linie).
- Die zeitlich verschoben erfüllte Milchleistung nimmt nur wenig ab (obere Linie).

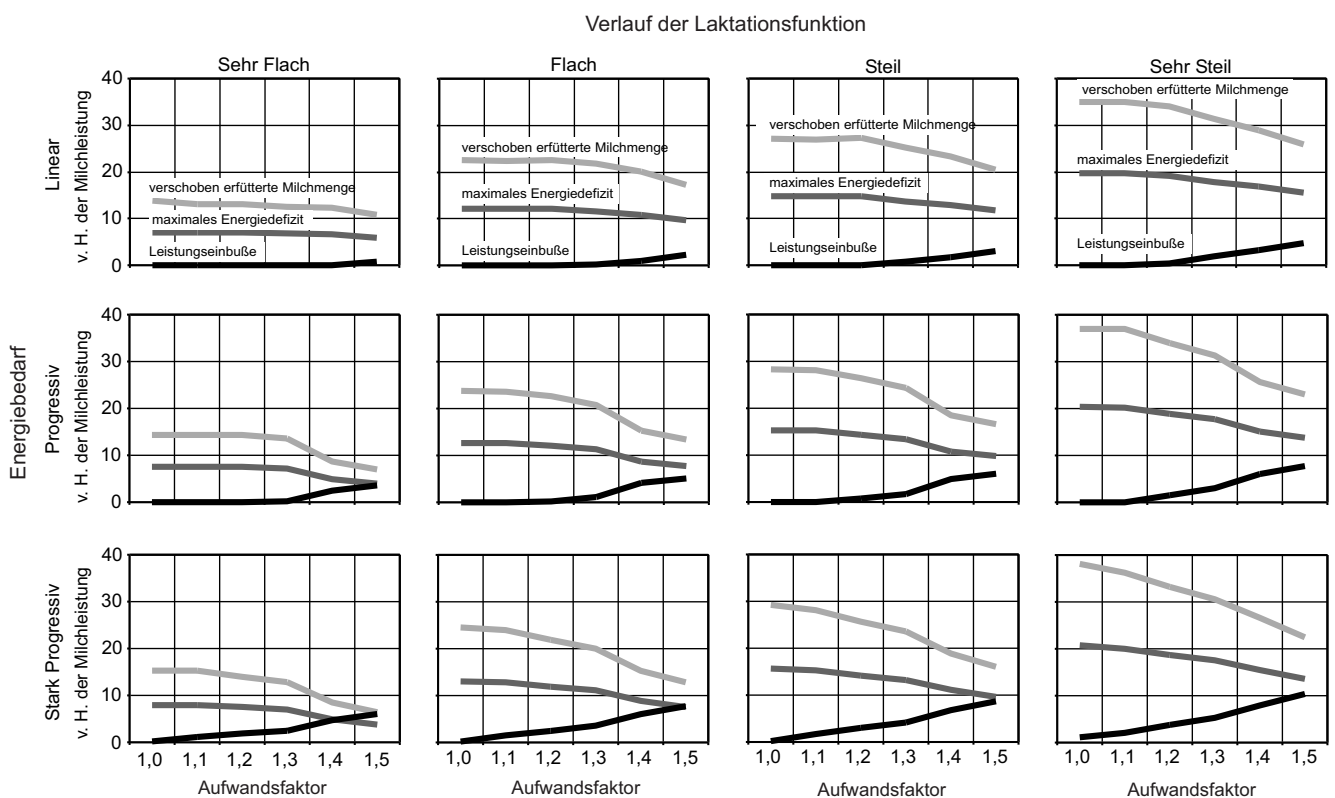


Abbildung 10:

Bedeutung des Aufwandsfaktors für die erzielbare Leistung, für die zeitlich versetzt zu erfütternde Milchleistung und für das maximale Energiedefizit

Die darunter angeordneten Teilgrafiken mit den Ergebnissen der Simulation bei progressivem und stark progressivem Energiebedarf in Kombination mit einem sehr flachen Verlauf der Laktationsfunktion erweisen sich bei verlustfreiem Ab- und Wiederaufbau der Reserven und der Körpersubstanz als nahezu gleich mit der Variante „linearer Energiebedarf“. Bei progressiv steigendem Energiebedarf beginnt bereits bei dem Aufwandsfaktor von 1,3 der Leistungsabfall, weil die zeitlich verschobene Versorgung den Gesamtenergie- und -nährstoffbedarf anhebt und so die maximal erzielbare Leistung absenkt. Damit wird die Erzeugung der höchsten Tagesleistungen aufwendiger und im Sinne der Energieverwendung ineffizienter. Bei stark progressiv steigendem Energiebedarf zeigt sich dieser Effekt schon bei einem Aufwandsfaktor von 1,1.

Ausgehend von der linken oberen Teilgrafik aus Abbildung 10 mit linearem Energiebedarf ergeben sich mit zunehmend steilerem Verlauf der Laktationsfunktion folgende Tendenzen: Die Leistungseinbuße wächst (untere Linie) mit dem Aufwandsfaktor, gleichzeitig damit steigt das maximale Energiedefizit von 7 % auf 20 % der Jahresleistung (mittlere Linie) und der Anteil der Milch, der zeitlich verschoben erfüllt werden muss, erhöht sich von 15 auf 35 % der Jahresmilchleistung (obere Linie).

Für alle hier untersuchten Konstellationen gilt, dass ein ungünstiger Aufwandsfaktor das Defizit mindert und gleichzeitig die maximal erzielbare Leistung absenkt. Dieser Effekt ergibt sich aus dem Anstieg der benötigten Energie- und Nährstoffmengen. Weil aber die Futteraufnahme im Modell gleich bleibt und ausgereizt ist, geht dieser zusätzliche Bedarf zu Lasten der Gesamtleistung und ist als Ursache für die zweite allgemein erkennbare Funktionalität anzusehen: In dem Umfang, wie der Energieaufwand für diese später zu erfüllende Leistung steigt, geht die maximal transferierbare Milchleistung zurück und mindert die Gesamtleistung (untere Linie).

Im Vergleich zur rechten oberen Teilgrafik mit sehr steilem Verlauf der Laktation und linearem Energiebedarf wirken sich der progressive und stark progressive Energiebedarf dahingehend aus, dass der Leistungsabfall schon bei geringeren Aufwandsfaktoren einsetzt und deutlich höher ausfällt. Die Ursache ist vorrangig in dem steigenden Energiebedarf für die letzte zeitlich verschoben erfüllte Milchmenge zu finden.

Abbildung 10 zeigt weiterhin, dass ein höherer Aufwandsfaktor einen etwas geringeren Einfluss auf die Zielgröße „maximale Milchleistung“ ausübt als die unterschiedlichen Energiebedarfsnormen und die Laktationsfunktionstypen. Ein ungünstiger Verlauf der Laktationsfunktion und ein zunehmend kritischer Aufwandsfaktor mindern die maximal erzielbare Milchleistung im Verbund, denn

- je steiler die Laktationsfunktion, umso mehr Milch muss zeitlich verschoben erfüllt werden
- je ungünstiger der Aufwandsfaktor, umso weniger Milch kann zeitlich transferiert werden.

Die vorteilhafteste Konstellation ergibt sich bei einer sehr flachen Laktationskurve und einem linearen Energiebedarf (Abbildung 10, Teilgrafik oben links). Hier bewirkt ein ungünstiger Aufwandsfaktor vergleichsweise wenig, denn die Milchleistung sinkt nur um 1 - 2 %. Bei der ungünstigsten Konstellation (Abbildung 10, Teilgrafik unten rechts) erreicht dagegen der Rückgang der Milchleistung mehr als 10 % der Jahresleistung. Für die weitere Steigerung der Milchleistung ist daher von großer Bedeutung, ob der Energiebedarf tatsächlich linear ausfällt oder progressiv steigt und mit welchem Aufwandsfaktor für den zeitlich verschobenen Ausgleich der Energiebilanz gerechnet werden muss, der nur mittels speziell angelegter Versuche zu bestimmen ist. Langfristig wird sich diese Wissenslücke als Engpass für die Fütterung der Hochleistungskühe erweisen.

4 Bewertung und Ausblick

Anfang der 80er Jahre reichte eine Milchleistung von 5.500 kg Milch aus, um einen Deckungsbeitrag von 1.250 € zu erzielen. Inzwischen ist dieser Deckungsbeitrag nur noch mit einer Durchschnittsleistung von über 7.500 kg Milch zu erwirtschaften (Walter et al., 2005). Da sich diese Entwicklung fortsetzt und damit eine weitere Steigerung der Milchleistung zu einem existentiellen Anliegen der Milchviehalter wird, analysiert dieser Beitrag einige kritische Hemmnisse, die der erforderlichen Verbesserung der Aufwands- und Ertragsrelationen im Wege stehen.

Die Einkreuzung der amerikanischen Blutlinien und die in den USA erzielten höheren Leistungen lenken das Interesse auf die amerikanischen Fütterungsnormen. Dabei wird deutlich, dass mit konstantem Energiebedarf bei negativer Gewichtsentwicklung der Kuh oder aber mit progressiv ansteigendem Bedarf für höhere Leistungen (NRC, 2001) bei konstantem „body condition score“ (NRC, 2001; Robinson, 2006) kalkuliert wird. Das führt zu gravierenden Unterschieden bei den Fütterungsempfehlungen für hohe (Tages)Leistungen. Daher werden in Anlehnung an das amerikanische Energiebewertungssystem¹⁴ progressiv steigende Bedarfswerte in die Analyse einbezogen und den linearen Versorgungsempfehlungen der DLG vergleichend gegenübergestellt.

Experimente zur Klärung der Frage nach dem Niveau

¹⁴ Das Energiebewertungssystem der USA kann wegen der unterschiedlichen Ansprache der Futtermittel nur näherungsweise adaptiert werden.

des zusätzlichen Energie- und Nährstoffaufwands beim Ab- und Wiederaufbau von Reserven und Körpersubstanz zur Erfüllung von höchsten Tagesleistungen liegen im deutschsprachigen Raum noch nicht vor. Zudem verfügt die Wissenschaft im Gegensatz zur Praxis nicht über Herden mit Leistungen von 12.000 kg Milch und mehr. Daher bieten die vorgelegten Kalkulationen eine erste Bewertung, die Hinweise für die Fütterung der Hochleistungskühe geben und eine Evaluierung der Interaktionen mit den übrigen Grundsätzen der Fütterung ermöglichen.

Hochleistungskühe geben über 16.000 kg Milch je Jahr (LKV Weser-Ems, 2005), die Spitzenleistung liegt inzwischen über 20.000 kg (LKV Weser-Ems, 2006). Der Energie- und Nährstoffbedarf für die höchsten Tagesleistungen überschreitet die in der Tagesration enthaltenen Nährstoffmengen deutlich, so dass diese Kühe im ersten Drittel der Laktation ihre Reserven aufbrauchen und Körpersubstanz abbauen, um die tatsächliche Tagesleistung zu erbringen¹⁵. Damit ist das Prinzip der leistungsgerechten Fütterung nicht mehr anwendbar. Vielmehr muss mit einer Phase defizitärer Versorgung und einer weiteren des Bilanzausgleiches gerechnet werden. Somit ist in diesen beiden Zeiträumen, die zusammen mehr als 200 Tage umfassen können, eine leistungsgerechte Fütterung unrealistisch.

Diese Sachverhalte sowie die Vielzahl der zusammengehörenden, aber unabhängig voneinander in Experimenten untersuchten Einzeleffekte gaben den Anstoß für die Entwicklung eines Optimierungs- und Simulationsprogramms¹⁶ zur ganzheitlichen Analyse der Milchviehhaltung und damit der Fütterung. Nur so lassen sich mit dem Entstehen der Defizite auch die Fragen nach dem optimalen Zeitpunkt des Bilanzausgleiches, den Folgekosten, dem Energiebewertungssystem und dem Aufwandsfaktor beantworten. Derartige Problemstellungen sind nur durch extrem vielschichtig und aufwändig angelegte Versuche zu klären, denn die Vielzahl der zu berücksichtigenden Variablen und deren große Streuung erfordern extrem hohe Tierzahlen. Daher bietet sich die Simulation als ein probates Mittel an, um diesen Komplex zu durchdringen und erste Antworten zu geben.

Das Simulationsprogramm kalkuliert die einzelnen Fütterungsabschnitte nicht mehr allein, sondern verbindet alle Perioden miteinander, erkennt Defizite und sorgt für den erforderlichen Bilanzausgleich. Die Lösung solcher komplexen Systeme gelingt mittels der „linearen Program-

mierung“, deren Algorithmus wiederholbare Ergebnisse liefert. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Formulierung und Kalkulation vieler Alternativen und sichert die Konstanz der Bedingungen.

Die fixen Kosten je Kuh und Stallplatz zwingen zur Ausnutzung der „economies of scale“ und verstärken die Effizienz der hohen Leistung je Kuh. Die hier vorgelegten Berechnungen zeigen, dass bei linearen wie auch bei progressiven Aufwands- und Ertragsrelationen der durchschnittliche Energiebedarf je kg Milch bei Leistungen bis 20.000 kg Milch nicht oder nur wenig ansteigt, so dass bis zu diesem Leistungsniveau mit sinkenden Stückkosten zu rechnen ist. Dementsprechend ist der Focus auf die angesprochenen Fragen auszurichten, da sie diesem Ziel und damit der weiteren Verbesserung der Aufwands- und Ertragsrelationen entgegenstehen.

Die Ergebnisse der Simulationen mit den Folgekosten zeigen erste Begrenzungen für beliebige Leistungssteigerungen. Werden für den Transfer von Defiziten in den nächsten Monat Folgekosten von über 3 Cent je kg Milch angesetzt, übersteigen die Gesamtkosten für jeden derart erzeugten zusätzlichen Liter Milch schließlich den Milchpreis. Dementsprechend lässt sich eine weitere Leistungssteigerung nur mit möglichst geringen Folgekosten effizient gestalten. Als Folgekosten kommen zunächst höhere Kosten für Tierarzt und Medikamente in Betracht, aber auch die Einkommen mindernden Effekte, wie kürzere Nutzungsdauer, längere Zwischenkalbe- und Günstzeiten etc..

Der Verlauf der Laktationsfunktion erweist sich bei den Kalkulationen als signifikant für das Niveau der Milchleistung und das Ausmaß der Defizite. Kühe mit einer ausgeprägten Leistungsspitze sind denen mit einer flach verlaufenden Kurve der Tagesleistungen nur dann ebenbürtig, wenn sie über einen ebenso ausgeprägten Verlauf der Futteraufnahme- und -verwertungskapazität verfügen. Versuche zeigen (Kaske, 2005; Drackley, 2005), dass die Kühe gerade zu Beginn der Laktation ihre Futteraufnahme eher zögerlich ausweiten und von Anfang an in eine defizitäre Bilanz geraten. Daher gewinnt das Zuchtziel einer flacheren Laktationsfunktion, also einer weniger ausgeprägten Leistungsspitze in Verbindung mit einer hohen Persistenz, zusätzlich an Bedeutung. Langfristig werden nur Kühe dieses Typs in diesen Leistungsbereichen „überleben“.

In der Landwirtschaft bilden lineare Aufwands- und Ertragsrelationen im Bereich hoher Erträge und Leistungen die Ausnahme, so dass in den hier diskutierten Leistungsbereichen von einem abnehmenden Ertragszuwachs auszugehen ist, der sich zusätzlich durch Verluste beim Abbau und anschließendem Wiederaufbau von Reserven und Körpersubstanz auswirkt. Die vorgelegten Kalkulationen weisen darauf hin, dass dieser (Kombinations-) Effekt einer Weiterentwicklung hemmend entgegensteht.

¹⁵ Dabei bleibt offen, ob die Kuh unter günstigeren Konditionen eine noch höhere Leistung erbrächte und hier noch Reserven aktivieren könnte oder das genetische Potential bereits ausgeschöpft ist.

¹⁶ Eine detaillierte Beschreibung des Simulationssystems, der implementierten methodischen Ansätze, der Programmstruktur sowie eine Bedienungsanleitung liegen vor (Walter 2007). Das Programm kann die komplexen Probleme um abnehmende Milchinhaltsstoffe ebenso berücksichtigen wie das Geschehen um den body condition score, Krankheiten, Klima etc.

In norddeutschen Betrieben¹⁷ werden mittlerweile mehrere hundert Kühe gehalten, die über 15.000 kg Milch produzieren (LKV Weser-Ems, 2006 und 2007; LKV Schleswig-Holstein, 2006). Einige Betriebe erreichen im Herdenmittel ein Leistungsniveau von 11.000 bis 12.000 kg Milch. Ein zeitlich verschobenes Erfüttern von Leistung gilt als „selbstverständlich“ und wird nicht explizit diskutiert. Erst ein ausgeklügeltes, alle Bereiche umfassendes Managementsystem mit den Schwerpunkten hohe Leistung, leistungsorientierte Züchtung, effiziente Jungviehaufzucht, optimaler Futterbau, gezielte Gülleverwendung, tiergerechter Technikeinsatz und intensiver Tierkontrolle macht eine Milchviehhaltung mit herausragenden Leistungen möglich. Die bisher vorgelegte Analyse umfasst nur einen kleinen Ausschnitt dieses Spektrums und ist problemorientiert zu erweitern, um der Komplexität der Milchproduktion gerecht zu werden. Die optimale Anpassung und Orientierung des Komplexes Futterbau an zukünftige Leistungen wird im Zentrum weiterer Arbeiten stehen.

Die wachsenden Anforderungen an die Qualität von Milch und Fleisch, die enger werdende vertikale Integration, die höheren Anforderungen an Tier- und Umweltschutz erfordern¹⁸ eine zunehmend engere Zusammenarbeit zwischen Milchproduzenten, Kontrollinstanzen, Veterinären, Beratern, Zuchtverbänden usw. Einer engeren Kooperation der verschiedenen Instanzen und Institutionen stehen die unterschiedlichen Interessen und Aufgaben, aber auch die konträren Positionen und Blickwinkel entgegen. Das hier vorgestellte Simulationsprogramm ist in der Lage einige dieser abweichenden und zum Teil gegensätzlichen Positionen zu berechnen, zu vergleichen und zu bewerten.

Da die Milchproduktion einem ständigen Anpassungsprozess unterlag und unterliegt, dienen diese Simulationen der Suche nach dem bestmöglichen Entwicklungspfad, um das bisherige Prinzip „try and error“ durch gezielt erkundete Alternativen zu ersetzen. Daher werden die später folgenden Arbeiten zunächst auf den Komplex Futterproduktion sowie auf die Konzeption von Fütterungs- und Haltungsverfahren für Hochleistungskühe ausgerichtet.

Literatur

Bockisch F-J (1990) Quantifizierung von Interaktionen zwischen Milchkühen und deren Haltungsumwelt als Grundlage zur Verbesserung von Stallsystemen und ihrer ökonomischen Bewertung. 270 p, Forschungsber Agrartechnik 193

Bockisch F-J, Vorlop K-D (eds) (2006) Aktuelles zur Milcherzeugung : Vortrags-

tagung im Forum der FAL am 15. November 2005, gemeinsam veranstaltet von der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) und der Gesellschaft der Freunde der FAL. Braunschweig : FAL, 144 p, Landbauforsch Völknerode SH 299

Danzig GB (1963) Linear programming and extensions. Princeton Univ Pr Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (1991)-DLG-Futterwerttabellen für Wiederkäuer. Frankfurt a M : DLG-Verl, 112 p

Drackley JK (2005) Fütterung und Management der Milchkuh im peripartalen Zeitraum [online]. Zu finden in <<http://www.dr-pieper.com/frame.php?seite=service/publikationen>>

Evans E (2003) Auswirkungen von Stoffwechselstörungen auf die Fruchtbarkeit. In: Pieper B (ed) Tagungsbericht 2003 : 7. Symposium Fütterung und Management von Kühen mit hohen Leistungen ; 23.01.2003 in Neuruppin. Wuthenow : Dr. Pieper Technologie- und Produktentwicklung, pp 5-31

Helmers M (2005) Optimierungsstrategien zur ökonomischen Bewertung von Grundfutter. Fachhochschule Osnabrück [Diplomarbeit]

Hutjans M-F (2003) Aktuelle Aspekte der Milchviehfütterung in den USA unter besonderer Berücksichtigung der neuen amerikanischen Fütterungsnormen. In: Pieper B (ed) Tagungsbericht 2002 über das 6. Symposium zu Fragen der Fütterung von Kühen mit hohen Leistungen am 01.02.2002 in Neuruppin. Wuthenow : Dr. Pieper Technologie- und Produktentwicklung, pp 9-33

Isermeyer F (ed) (2002) Milchproduktion 2025 : Vortragstagung im Forum der FAL am 5. März 2002, gemeinsam veranstaltet von der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) und der Gesellschaft der Freunde der FAL. Braunschweig : FAL, 103 p, Landbauforsch Völknerode SH 242

Ilili DairyNet (2006) <http://dairynettrill.uiuc.edu/>

LKV Weser-Ems (2006) Jahresbericht 2005 [online]. Zu finden in <<http://www.lkv-we.de>>

LKV Weser-Ems (2006) http://www.lkv-we.de/Leistungen_2005.html

LKV Weser-Ems (2007) http://www.lkv-we.de/Leistungen_2006.html

LKV Schleswig-Holstein (2006) <http://www.lkv-sh.de/uploads/media/Jahresbericht2006.pdf>

Kaske M, Horstmann K, Seggewiß S, Flachowsky G, Meyer U (2006) Die Futteraufnahme der „Transition Cow“ : Schlüssel für die Tiergesundheit? Landbauforsch Völknerode SH 299:29-42

Land AH, Powell S (1973) Fortran codes for mathematical programming: linear, quadratic and discrete. London : Wiley, 249 p

Meinhold K, Rosegger S, Schlünsen D, Walter K (1976) Die Futterkosten bei unterschiedlichen Methoden der Rationsermittlung und -bemessung für Milchkühe. Landbauforsch Völknerode SH 35:131-189

Meyer U (2005) Fütterung der Milchkühe. Landbauforsch Völknerode SH 289:111-121

National Research Council (2001) Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, DC : National Academy Press, Nutrient requirements of domestic animals

Olteneacu PA, Rounsaville TR, Milligan RA, Hintz RL (1980) Relationship between days open and cumulative milk yield at various intervals from parturition for high and low producing cows. J Dairy Sci 63:1317-1327

Pieper B (ed) Tagungsberichte 1.(1998) bis 10.(2006) Symposium zu: Fütterung und Management von Kühen mit hohen Leistungen

Rinderspezialberatung der Landwirtschaftskammer Schleswig Holstein, (2003) Einzelbetriebliche Daten aus ca. 1600 Betrieben von 1995 bis 2001. Mit freundlicher Genehmigung der Landwirtschaftskammer Schleswig Holstein vom 30. 06. 2003

Robinson PH (2006) Excel spreadsheets : PredDMI.xls, NRGREQ.xls u. a. [online]. Zu finden in <<http://animalscience.ucdavis.edu/faculty/robinson/Excel/default.htm>>

Rohr K (1972) Untersuchungen über die Futteraufnahme und Futterverwertung bei Milchkühen verschiedener Rassen unter besonderer Berücksichtigung des Grünfutters. Kieler Milchwirtsch Forschungsber 24(1):23-96

¹⁷ Neben den beiden hier genannten Landeskontrollverbänden können andere Kontrollverbände ähnlich hohe Leistungen ausweisen. Im Internet stellen die Suchmaschinen unter dem Suchwort „LKV“ alle notwendigen Adressen zur Verfügung.

¹⁸ In der Praxis entstehen sehr oft Probleme, weil Spezialisten ihre eigenen Vorstellungen in den Vordergrund stellen. Die erforderliche (Fein) Abstimmung mit den übrigen Beratungsempfehlungen kommt häufig zu kurz.

- Walter K (1976) Zur Frage einer periodisch begrenzten Über- und Unterfütterung von Milchkühen und ihrer Auswirkung auf die Futterkosten. *Landbauforsch Völkenrode* SH 35:64–88
- Walter K, Heinrich I, Böckmann U (1998) Entwicklung des Einsatzes und der Preise von Grund- und Kraftfutter in der Rinderhaltung : 20 Jahre „Arbeitskreis Forschung und Praxis“ in der FAL. *Ber Landwirtschaft* 76(1):87–104
- Walter K (2004) Analyse der Beziehung zwischen den Kosten für Tierarzt und Medikamente in der Milchviehhaltung und der Produktionstechnik, dem Futterbau, der Arbeitswirtschaft sowie der Faktorausstattung ausgewählter norddeutscher Betriebe. Braunschweig : FAL, 180 p, *Landbauforsch Völkenrode* SH 270
- Walter K, Bockisch F-J, Ohrtmann J, Thomsen J (2005) Entwicklung der Milchleistung, des Kraftfuttereinsatzes und der Grundfutterqualität. *Landbauforsch Völkenrode* 55(2):119-126
- Walter K (2007) Das Simulationsprogramm „Milchproduktion der Zukunft“ – Methodischer Ansatz und Realisierung : Version 1. Braunschweig : FAL, 64 p, *Ber Inst Betriebstechn Bauforsch* 390

Assessment of DNA contents of soil fungi

Traute-Heidi Anderson¹

Abstract

DNA extractions from microorganisms under soil conditions have been published to a great extent during the last decade. A quantitatinal approach was, however, rarely attempted so that until today there is hardly a data source available which gives information on DNA contents of microorganisms, i.e. fungi, on a dry weight basis. This is however a very necessary aspect, particularly when an extraction protocol per se should be tested for its efficacy or particularly as well in ecological studies, where it would be important to have an unbiased extraction procedure. That is, the procedure used should be optimal for DNA extraction of both bacteria and fungi to the same extent. Since the majority of extraction protocols used today were designed to extract DNA from bacteria, it was found necessary to examine our own extraction procedure (Blagodatskaya et al., 2003) for its applicability to extract DNA from soil fungi.

DNA extractions from 25 soil fungal species resulted in a mean dsDNA recovery of $3.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight with a range of $0.92 \mu\text{g mg}^{-1}$ to $6.32 \mu\text{g mg}^{-1}$. However, a modification of the original extraction procedure by omitting aurintricarboxylic acid (ATA) but adding a Glucanex-lyticase enzyme complex which was tested on ten fungal species resulted in a doubling of dsDNA yields with a mean of $6.45 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight (range $4.2 \mu\text{g mg}^{-1}$ to $8.7 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight), whereby eight of the ten species gave DNA yields above $6.0 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight, which indicates that in our study the DNA yields were very much comparable between species. No apparent relationship existed between the innate growth rate of fungal species and DNA yields obtained; but yields decreased with the age of the fungal cultures.

As investigated by video-fluorescence microscopy a complete hyphal disintegration did not seem necessary for obtaining a high DNA yield but rather the rapidity of the extraction process together with the miniaturization of the samples promoted a high recovery.

Keywords: *soil fungi, dsDNA extraction, lytic enzymes*

Zusammenfassung

Bewertung der DNA-Gehalte von Bodenpilzen

DNA Extraktionen von Mikroorganismen unter Bodenbedingungen sind während der letzten zehn Jahre vermehrt publiziert worden. In den meisten Fällen wird keine quantitative Aussage von DNA-Gehalten der Organismen auf Trockengewichtsbasis gegeben. Dieses ist aber ein sehr notwendiger Aspekt, wenn es darum geht das eigene Protokoll auf die Extraktionsgüte zu überprüfen und ebenso ein wichtiger Aspekt in ökologischen Untersuchungen, wo es nicht wünschenswert wäre, wenn das Extraktionsprotokoll bevorzugt nur DNA aus Bakterien oder nur Pilzen extrahieren würde. Da die Mehrheit der heutigen Extraktionsprotokolle zur DNA-Extraktion für Bakterien entwickelt wurde, erschien es notwendig, unser eigenes Extraktionsprotokoll (Blagodatskaya et al., 2003) dahingehend zu überprüfen, inwieweit es sich für die DNA-Extraktion von Pilzen eignet.

DNA-Ausbeuten von 25 Pilzarten lagen bei $3.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ Trockengewicht (TG) in einer Bandbreite von $0.92 \mu\text{g mg}^{-1}$ bis $6.32 \mu\text{g mg}^{-1}$. Dieses ist ein befriedigendes Ergebnis verglichen mit DNA-Gehalten aus Pilzen unter Reinkultur. Eine Modifizierung des Extraktionsprotokolls durch Weglassen von Aurintricarboxylsäure (ATA) und Zufügen von einem Glucanex-Lyticase Komplex ergab eine Verdopplung der Ausbeuten an dsDNA mit einem mittleren Wert, der bei $6.45 \mu\text{g mg}^{-1}$ TG lag. Dabei ergaben acht von den zehn hier getesteten Arten eine Ausbeute über $6.0 \mu\text{g mg}^{-1}$. Dies deutet darauf hin, dass in unseren Untersuchungen die DNA-Werte der Pilze sehr gut vergleichbar sind. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate der Arten und der potentiellen DNA Ausbeute gefunden; jedoch wurde die Ausbeute mit dem Alter der Organismen geringer.

Über Video-Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eine komplette Desintegration der Hyphen nicht notwendig war, um hohe DNA-Ausbeuten zu erhalten; eher ist die Schnelligkeit des Extraktionsprozesses zusammen mit der Miniaturisierung der Proben ausschlaggebend für hohe Ausbeuten.

Schlüsselwörter: *Bodenpilze, dsDNA Extraktion, lytische Enzyme*

¹ Johann Heinrich von Thünen-Institut, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Institute of Biodiversity, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig/Germany; Email: heidi.anderson@vti.bund.de

1 Introduction

The possibility to extract DNA directly from soil microbial communities has initiated new approaches in microbial ecology for nearly two decades now. Methods such as the polymerase chain reaction are used for the detection and monitoring of microorganisms in soil microbial communities (Holben et al., 1988; Harris, 1994; see also discussion Ogram, 2000), for description of the community composition with respect to the ratio of fungal to bacterial DNA in soil (Harris, 1994) or as an additional sum parameter for estimating microbial biomass or its growth in situ (Marstorp and Witter, 1999; Blagodatskaya et al., 2003; Joergensen and Emmerling, 2006). Growth rates are traditionally used in microbial physiology to quantify the response of microbial cells to its environment (Pirt, 1975). It is one of the most sensitive microbial parameters for the detection of detrimental or positive impacts on microbial cells. Principally this approach could be adapted to microbes under soil condition, i.e. agricultural soils, for studying the effects of pesticides, heavy metal toxicity, pollutants, or global change effects on microbial communities (total biomass of bacteria and fungi). This requires optimal extraction of soil DNA. Published extraction procedures vary widely, but for more than a decade now DNA extraction by direct lysis methods (Ogram, 1987; Tien et al., 1999; Ogram, 2000; Robe et al., 2003) are most commonly applied. The cell lysis protocol which we adopted for soil extraction (Blagodatskaya et al., 2003) was based on publications by Sandaa et al. (1997) who introduced the fluorometric detection of dsDNA using PicoGreen® (Molecular Probes, Inc.) as a fluorescent dye and several published sources with respect to lysis procedures (Ogram, 1987; Sayler et al., 1991; Clegg et al., 1997; Marstorp and Witter, 1999). As an alternative to the often used freeze-thawing cycle procedure for physical disruption, we adopted a bead-beating method, a method most commonly used now with reports on superior DNA yields (Moré et al., 1994; Tanaka et al., 1996; van Burik et al., 1998; Müller et al., 1998; Haugland et al., 1999; Reeleder et al., 2003; Fredricks et al., 2005; Griffiths et al., 2006).

The reason for reconsidering the above techniques is that fungi have a more rigid cell wall than bacteria. The possibility that a lysis protocol could favour bacterial DNA extraction existed. Tien et al. (1999) presented evidence that a direct lysis procedure might not extract fungal DNA. A similar observation was mentioned recently by Fierer et al. (2005). Since our final goal is to quantify total microbial biomass growth in soil we found it necessary to check if the lysis protocol used would as well be optimal for DNA extraction from fungi. In total twenty-five fungal species belonging to different taxa were analysed using the direct lysis method (Blagodatskaya et al., 2003).

Here we report on the optimization of the extraction protocol and comparisons of fungal DNA yield with respect to the pertaining literature. In addition, aspects on the physical disruption of cell walls as analyzed by video-fluorescence microscopy or innate growth rates of fungal species and DNA yields are discussed.

2 Materials and methods

2.1. Fungal species, culture conditions and harvesting procedure

Strains of fungal species used in this study and their sources are given in Table 1. Stock cultures were maintained on Martin's agar as slant cultures and stored at 4 °C until use. For production of mycelium for DNA extraction, small pieces of fungal slant cultures were transferred to 200 ml fresh sterile modified Czapek-Dox liquid medium with yeast extract in 250 ml Erlenmeyer flasks and adjusted to pH 7.0. Per fungus and experiment three to five replicate cultures were set up. The flasks were kept at room temperature (20 - 25 °C) on an orbital shaker (Infors AG) at 100 rev min⁻¹ in daylight. Mycelium of replicate cultures was harvested and combined by vacuum filtration using a Buchner funnel with sterile glass fibre filters GF 6 (Schleicher & Schuell). Mycelia was placed in Falcon tubes under sterile conditions and washed twice with 0.2 % sodium hexametaphosphate by centrifugation (5000 rev. min⁻¹ for 10 min) to remove media sticking to the hyphae. The pellet was transferred into a new Falcon tube under sterile conditions containing sterile TE buffer (10 mM Tris/1 mM EDTA, SIGMA) in the ratio mycelia:TE buffer (1:5 w/v). The pellet was macerated with an Ultra-Turrax® (IKA) (~18.000 rev. min⁻¹) for one minute with cooling on ice. Shaft and rotor of the dispersing device had been cleaned beforehand with 70 % ethanol and sterile HPLC grade H₂O. The mycelium was again harvested by centrifugation (5000 rev. min⁻¹ for 10 min) and the pellet collected was blotted dry with sterile paper towels.

Mycelium dry weight was assessed by pre-weighted glass dishes plus mycelium and then oven-dried (105 °C, 24 h) and again weighed.

2.2. Extraction of fungal DNA

2.2.1. Lysis protocol I

25 - 100 mg mycelium (wet weight) was transferred to 2.0 ml sterile polypropylene microfuge tubes (Neo-Lab) which contained in total 600 mg acid-washed glass beads (SIGMA), 200 mg of each size (106 µm, >212 µm, >710 µm). In total, one ml lysis solution TE buffer (50 mM/ 5mM) was added: containing 1 % (10 mg) sodium

Table 1:

DNA recovered from soil fungal mycelium with lysis protocol I

Species	Strain ^a no.	Age of culture (days)	dsDNA $\mu\text{g mg}^{-1}$ (dry weight)	Mean growth rate ^b (cm/day)
<i>Alternaria</i> spec. Nees	F1	6	5.34 $\pm$ 0.16	0.73
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	F7	4	4.51 $\pm$ 0.37	0.65
	F7	14	2.83 $\pm$ 0.31	
	F7	35	1.12 $\pm$ 0.12	
<i>Botrytis allii</i> Munn	F14	19	4.00 $\pm$ 0.27	0.53
<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis & Arth.	F85	26	1.58 $\pm$ 0.05	0.29
	F85	34	1.14 $\pm$ 0.07	
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link ex Gray	F86	19	2.41 $\pm$ 0.12	0.33
	F86	35	0.79 $\pm$ 0.10	
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.	F94	7	3.01 $\pm$ 0.04	1.20
	F94	25	1.93 $\pm$ 0.09	
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.em. Sny. & Hans.	DSMZ/2018	10	3.81 $\pm$ 0.12	1.12 ^c
<i>Hormodendrum olivaceum</i> (Corda) Bon.	F52	7	1.77 $\pm$ 0.02	0.41
<i>Linderina pennisporea</i> Raper & Fennel	Z13	21	0.92 $\pm$ 0.04	0.26
<i>Mortierella ramanniana</i> (Möller) Linnem.	Z16	4	5.65 $\pm$ 0.50	0.43
	Z16	12	3.59 $\pm$ 0.14	
	Z16	35	1.55 $\pm$ 0.15	
<i>Mucor flavus</i> Bain.	Z24	12	4.44 $\pm$ 0.43	0.33
<i>Mucor mucedo</i> Mich. ex St.-Am. [#]	Z26	3	2.80 $\pm$ 0.18	1.42
<i>Oidiodendron rhodogenum</i> Robak	F55	6	4.97 $\pm$ 0.11	0.14
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	F56	12	5.00 $\pm$ 0.41	0.51
<i>Penicillium camembertii</i> Thom	F61	14	2.45 $\pm$ 0.16	0.45
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	F90	8	5.70 $\pm$ 0.40	0.45
	F90	15	3.47 $\pm$ 0.28	
<i>Penicillium notatum</i> Westling	F66	8	6.32 $\pm$ 0.27	0.20
	F66	21	2.19 $\pm$ 0.06	
<i>Penicillium notatum</i> (Fleming) Westling	F65	8	4.92 $\pm$ 0.01	0.34
	F65	13	3.56 $\pm$ 0.26	
<i>Pythium ultimum</i> Trow	DSMZ/62987	5	4.75 $\pm$ 0.02	3.0 ^c
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	DSMZ/63010	36	2.12 $\pm$ 0.04	> 2.8 ^c
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb. ex Link) Hughes	F73	8	3.15 $\pm$ 0.10	0.15
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	DSMZ/63059	8	2.60 $\pm$ 0.19	1.80 ^c
	DSMZ/63059	13	5.68 $\pm$ 0.07	
<i>Trichoderma (Gliocladium) virens</i> (Miller, Giddens & Foster) Arx [#]	DSMZ/1963	4	3.26 $\pm$ 0.06	1.16 ^c
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Gray	F77	4	3.70 $\pm$ 0.21	1.42
	F77	34	2.60 $\pm$ 0.01	
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link ex Gray	DSMZ/860	34	3.02 $\pm$ 0.08	0.90 ^c

^a Fungal strains marked with F were obtained from the culture collection of the Institute of Microbiology, University of Braunschweig; strains designated with DSMZ were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig

^b Unless otherwise stated cultures were grown on agar plates at 25 °C (incubator)

^c Growth conditions and growth rates according to Domsch et al., 1980

[#] Species with additional growth studies and DNA monitoring (see Figure 2)

$\pm$ Standard deviation of mean DNA values obtained from three extractions and two measurements each (> n = 6), see Material and Method section

dodecylsulfate (SDS) (SIGMA), 1 mM (0.42 mg) aurintricarboxylic acid (ATA) (SIGMA) and 0.02 % (0.2 mg) proteinase K (PK) (Roth). The enzyme lyticase (yeast lytic enzyme from *Arthrobacter luteus*, 360953 MP Biomedicals) was added at a final concentration of 300 U, and chitinase (SIGMA) at a final concentration of 0.1 % (1 mg). All ingredients had been solved in TE buffer (50 mM/5 mM). The final pH of the lysis solution was 7.7. All ingredients were used fresh. Tubes were then either vortexed for 25 min (Vortex-Genie2T with platform for reaction tubes at speed 8, Scientific Industries) or placed in a FastPrep® instrument (Q. Biogen, Inc.) for 2 x 45 sec at speed 6.5 and then transferred to a linear shaking water bath (gentle speed) at an incubation temperature of 65 °C and left for 60 - 90 min. Tubes were then centrifuged at 10.000 rev min⁻¹ for 5 min. The supernatant containing the DNA extract was processed as described under 2.3.

2.2.2. Lysis protocol II

50 mg mycelium (wet weight) was transferred to sterile microfuge tubes containing glass beads as described under 2.2.1. Lysis solution was identical to lysis protocol I except that aurintricarboxylic acid (ATA) was not added. As an alternative to chitinase, the enzyme complex Glucanex® (from *Trichoderma harzianum* L1412 Sigma) was used and added at a final concentration of 4 % (40 mg/ml per microfuge tube). Lyticase was applied in the same concentration as under 2.2.1. Tubes were placed in a FastPrep® instrument (Q. Biogen, Inc.) for 2 x 45 sec at speed 6.5 and then transferred to a rotating (450 rev min⁻¹) thermomixer (Eppendorf) at an incubation temperature of 65 °C as an alternative to a water bath and left for 90 min.

Proof of the lysing efficiency was determined exemplarily by plating the contents of the mycelial lysis solution of *Mucor mucedo* and *Fusarium culmorum* after the bead beating step (FastPrep®) on petri dishes containing Martin's agar. Plates were placed in an incubator at 25 °C for 14 days. During this period no growth occurred.

2.3. Determination of extracted DNA

The quantity of DNA obtained in the extracts was determined by making a 100-fold dilution of the extract (50 µl aliquot in 4.95 ml TE (10 mM Tris/1 mM EDTA buffer)). From this, aliquots of 0.5 ml were then transferred to plastic disposable cuvettes (Sarstedt, No.67.742). A 200-fold dilution of the dsDNA stain PicoGreen® (Molecular Probes) (Sanda et al., 1998) was prepared according to the product's information sheet of the manufacturer and 0.5 ml of the dye was added to the cuvettes (making a final 200-fold dilution of the extract) and left to react at room temperature in the dark for 2 min. Fluorescence intensity

was measured with an SFM 25 fluorescence photometer (Kontron Instruments AG). Samples were excited at 480 nm and fluorescence emission intensity was measured at 525 nm. The fluorescence photometer was calibrated using 1000 ng bacteriophage lambda DNA (SIGMA, No D3779) as standard. Lysis solution or lysis solution containing lytic enzymes together with PicoGreen® was used as a blank. The efficiency of the fluorescence photometer was checked beforehand by generating a DNA standard curve according to the experimental protocol of the PicoGreen® manufacturer.

DNA yield was either determined immediately after extraction or extracts were stored in the refrigerator (4 °C) for maximal 48 h. DNA yield was expressed as µg DNA mg⁻¹ dry weight.

2.4. Microscopy

The fluorescence dye acridine orange (AO) (Clark, 1981) was diluted 1:6000 fold in tap water. 0.5 ml of the mycelia:TE buffer (1:5 w/v) as described under 2.1. and 0.5 ml of the AO solution were mixed and the fungal material stained for 10 min in the dark. After staining, the hyphal material was washed twice in Eppendorf cups containing Hepes buffer with 2 % glucose by centrifugation at 10.000 rev min⁻¹ for 5 min. The pellet was transferred to 1 ml Hepes buffer and 20 µl were placed on a glass slide with a cover slip for examination under the microscope.

Fluorescent images were obtained with an epi-fluorescent microscope (Zeiss-Axioplan), a triple band filter set (Zeiss Nr. 25; excitation: 400 - 570 nm, emission: 460 - 610 nm). Pictures were captured via a cooled CCD camera (DIE-470T, Optronics Engineering). For image processing a software Lucia G, vers. 3.52a (NIKON) was used. Objectives used were either a Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.35 or 20x/0.50.

2.5. Determination of cell carbon

Fungal mycelium was obtained and dried as described under 2.1. Hyphae were homogenized using a ball mill MM301 (Retsch GmbH, Germany). 100 mg dry weight material was taken for carbon analysis using a TruSpec CN Determinator (Leco Corporation). Four replicates per fungus were analysed.

2.6. Statistical analysis

Pair-wise comparison between groups of treatments were done using one-way ANOVA (Holm-Sidak method: overall significance level = 0.05) with Sigma Stat for Windows-Vers.3.0 (SPSS Science).

3 Results and discussion

3.1. Observations and pre-steps taken on DNA extraction for lysis protocol I

To assess whether our DNA extraction procedure used for soils (Blagodatskaya et al., 2003) would be applicable as well for fungal DNA extractions, some comparative analyses were done which preceded protocol I and observations made there will be described in short. This extraction procedure for total soil DNA is based mainly on the one described by Marstorp and Witter (1999) with the exception that the step of freeze-drying and grinding in liquid nitrogen was left out and as an alternative the bead beating procedure was employed (van Burik et al., 1998; Müller et al., 1998; Haugland et al., 1999; Griffin et al., 2002; Yamada et al., 2002; Griffiths et al., 2006) and by Sandaa et al., (1998) with respect to lytic ingredients and the fluorometric quantification of DNA using PicoGreen® as a specific dsDNA marker. At the end the bead beating procedure allowed a miniaturization and a great reduction of time in the whole process.

Lysozyme, a necessary enzyme in soil DNA extraction (bacteria), did not increase fungal DNA yields and was omitted. On the contrary, proteinase K, an enzyme which inactivates DNases but degrades as well the histones that package the DNA into chromosomes, was very essential. If this step was excluded, yields decreased (see also Tsai and Calza, 1992). DNA yields increased with time of incubation (65 °C, water bath) with proteinase K. A 90 minute incubation time was chosen, since a more prolonged incubation time did not lead to significantly higher yields. Pre-incubation with lytic enzymes such as lyticase or chitinase is the common procedure for obtaining protoplasts (see below under 3.2.1). In contrast to the finding by Karakousis et al., (2006) enzymatic pre-incubation per se significantly decreased DNA yields in all cases, the longer the pre-incubation time lasted, the lower the DNA yield. For that reason the lytic procedure was designed in such a way that all lytic steps would take place in the microfuge tube.

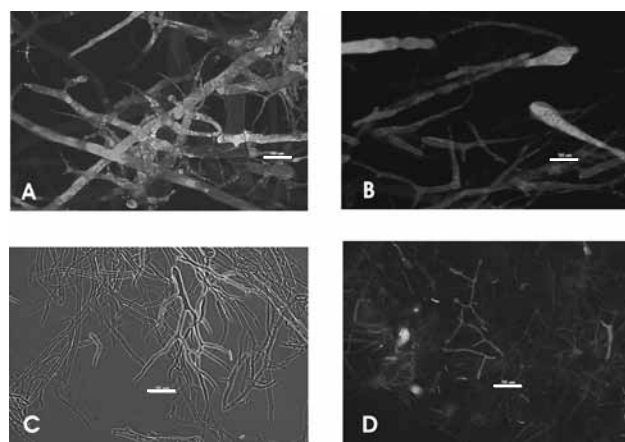
There was a trend in increases of DNA yield when the initial weight of hyphal material was reduced from 100 mg to 50 mg or 25 mg. This occurrence was, however, not studied in detail.

Previous to the FastPrep®flbeater for physical cell disruption continuous vortexing was applied for 25 min (2.2.1). With the exception that the FastPrep® beater shortens the whole procedure very much, there were no significant differences with respect to DNA yield between the two instruments.

Storage of samples after DNA extraction under freezing conditions is detrimental to DNA estimations. Best results

were obtained when the extracts were analyzed immediately or were stored in the refrigerator (4 °C) for a maximum of 48 h.

A recent paper by Karakousis et al. (2006) on cell wall disruption and lysis methods assessed the degree of disintegration of hyphal material of a number of fungal strains by various treatments. Their assumption was the greater the effect on cell wall disintegration, the greater the potential yield of DNA. Unfortunately, a quantitative assessment in terms of DNA yield on a dry weight basis and its allocation to the different disruption procedures was not done. In contrast to this report, our experience with epifluorescence microscopy using the vital dye acridine orange as shown in Figure 1 or FUN-1 for viability testing (Millard et al., 1997) (not shown) revealed hyphae which were not disintegrated, however showed a diminished fluorescence in comparison to controls, a sign that the cells were not metabolically active or "dead". The fact that no growth occurred after the bead beating procedure (see 2.2.2) is a sign that the organisms were killed. Apparently, total cell wall desintegration does not seem necessary for obtaining high yields of fungal DNA. However, the lytic enzymes seem to weaken the cell wall or support porous conditions so that the lysis solution can react more easily.



— = 50 µm

Figure 1:

Hyphae of *Mucor mucedo* after different disintegrating treatments and examined by fluorescence video-microscopy using acridine orange as a vital dye. (A) *M. mucedo*, no treatment. (B) Image taken after 3 min in lyticase. (C) Image taken after 6 h in Glucanex and viewed under phase 3. Cell wall structures are clearly visible but cells seem hyaline (empty). (D) Image taken after bead beating. To summarize: disintegrating treatments left cell walls intact; however the fluorescence diminished as seen between images (A) and (B + D). White bar measures 50 µm. Magnifications were 200x (A - C) and 100x (D), respectively. *M. mucedo* stands exemplarily for a number of fungi examined in this way.

3.2. DNA yield and age of fungal culture

Twenty-five strains of common soil fungal species were analyzed for their DNA yield using lysis protocol I. Total

dsDNA values are shown in Table 1. The mean DNA yield amounted to $3.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight (range 0.92 to 6.32). This seemed low compared to bacterial DNA, which takes 3 % - 13 % and more of the cells dry weight (Stouthamer, 1973; Brock and Madigan, Neidhardt, 1987; Christensen et al., 1995; Makino et al., 2003) depending on cell size and growth (Simon and Azam, 1989; Christensen et al., 1995). There was a trend that young mycelium had a higher DNA content (Table 1). Other authors reported similar observations (Gottlieb and van Etten, 1964; Dorn and Rivera, 1966; Karakousis et al., 2006). No obvious relationship between potential DNA yield and the natural growth rate of species was detected (Table 1). This is demonstrated exemplarily in Figure 2. The fungi *Mucor mucedo* and *Trichoderma (Gliocladium) virens*, both of which have fast growth rates, show different patterns of DNA yield over time. While the DNA yield of *M. mucedo* decreased with time, that of *T. virens* stayed constant at the beginning and then increased.

A literature search on fungal DNA contents is shown in Table 2. Although extraction protocols have changed considerably over the last 40 years, DNA yields are pretty much comparable with respect to order of magnitude with the exceptions of a few low values. Considered in

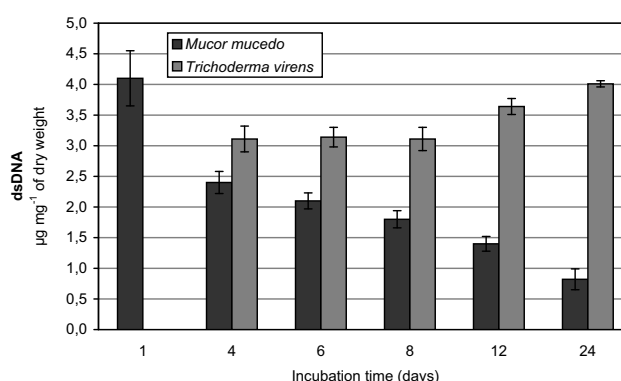


Figure 2:

Comparison of two soil fungi *M. mucedo* and *T. virens* with similar fast growth rates but with differing dsDNA yields during their growth period. Error bars indicate standard deviation of DNA yield of triplicate extractions with two DNA determinations each from one experimental set up.

this search were papers with DNA yields expressed quantitatively in $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight (or wet weight). There is a large amount of information on DNA yield where no quantitation was attempted (mainly those on PCR work) or where the information was too vague, or the values were related to unusual units not suitable for comparative purposes.

Table 2:

Examples of studies on fungal DNA extraction and DNA yield (arranged by year of publication)

Species	Age of culture (days)	DNA	
		$\mu\text{g mg}^{-1}$ (mycelial dry weight)	Reference
<i>Penicillium atrovenetum</i>	2 - 4	4.1 - 6.0	Gottlieb & van Etten, 1964
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	2.0	Dorn & Rivera, 1966
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2 - 8	6.0 - 9.0	Ramirez-Martinez, 1970
<i>Aspergillus oryzae</i>	3	2.0 - 4.0	Bajracharya & Mudgett, 1980
<i>Schizophyllum commune</i>	?	0.05 - 0.1 ^a	Specht, et al., 1982 [55]
<i>Aspergillus nidulans</i>	2?	1.5	Raeder & Broda, 1985
<i>Coprinus cinereus</i>	2	1.2	"
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	1.2	"
<i>Aspergillus sp.</i>	15 h	1.6	Bainbridge et al., 1990
<i>Fusarium graminearum</i>	10	1.9 - 5.2 ^a	de Nijs et al., 1996
<i>Fusarium culmorum</i>	10	5.4 - 7.7 ^a	"
<i>Fusarium poa</i>	10	5.6	"
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	0.74 ^a	van Burik et al., 1998
<i>Apergillus flavus</i>	10	0.34	Al-Samarrai & Schmid, 2000
<i>Apergillus niger</i>	10	0.39	"
<i>Rhizopus nigricans</i>	10	0.45	"
<i>Penicillium citrinum</i>	10	0.87	"
<i>Fusarium graminearum</i>	10	0.38	"
<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>	> 90	~0.4	Winton et al., 2002
<i>Aspergillus niger</i>	n.d.	0.4 - 0.5 ^a	Punekar et al., 2003
<i>Aspergillus nidulans</i>	"	"	"
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2.5 - 3.5 ^a	Jin et al., 2004
Six fungal species	14 - 21	0.1 - 1.0 ^a	Karakousis et al. 2006

a) Data were cited on a fresh weight basis

a) Data were cited on a fresh weight basis

Table 3:

Amount of DNA extracted from fungal species with lysis protocol I plus lytic enzyme amendments

Species	Taxon (Class)	dsDNA ($\mu\text{g mg}^{-1}$ mycelial dry weight)		
		control ^a	lytic enzymes	
			lyticase	chitinase
<i>Pythium ultimum</i> ^b	Oomycetes	4.06 $\pm$ 0.37	5.02 $\pm$ 0.63**	4.85 $\pm$ 0.57
<i>Mucor mucedo</i>	Zygomycetes	3.03 $\pm$ 0.35	3.05 $\pm$ 0.3	3.60 $\pm$ 0.12***
<i>Penicillium camembertii</i>	Ascomycetes (Fungi imperfecti)	4.49 $\pm$ 0.47	4.33 $\pm$ 0.10	4.70 $\pm$ 0.10*
<i>Fusarium culmorum</i>	Ascomycetes (Fungi imperfecti)	2.82 $\pm$ 0.19	3.41 $\pm$ 0.49	3.62 $\pm$ 0.74**
<i>Rhizoctonia solani</i>	Basidiomycetes (Hyphomycetes)	2.92 $\pm$ 0.32	3.29 $\pm$ 0.11**	3.54 $\pm$ 0.24***

^a Protocol I without lytic enzyme amendments.
^b Age of culture in days: P. ult.-6; M. muc.-4; Pen. cam.-6; Rh. sol.-6; Fus. cul.-7.
 $\pm$ Standard error of mean (SEM). DNA values obtained from at least three repeated experiments with triplicate extractions and duplicate DNA determinations each.
Significances are expressed as * $\leq P < 0.05$, ** $\leq P < 0.01$, *** $\leq P < 0.001$ with respect to control values.

3.2.1. Effect of enzyme amendments of Lyticase and Chitinase to the lysis protocol I

Fungi have a very rigid cell wall with either a chitin-chitosan (Zygomycetes), chitin-glucan (Ascomycetes, Basidiomycetes) complex as the major cell wall component except for Oomycetes which have mainly cellulose instead. In studies for obtaining protoplasts or for extracting DNA from spores, the use of lytic enzymes is very common (Hamlyn et al., 1981; Deshpande, 1986; Tsai and Calza, 1992; Birch and Denning, 1998; Watts et al., 1998; Jung et al., 2000; Balasubramanian et al., 2003; Farifà et al., 2004). To investigate if lytic enzyme amendments would improve our DNA yield lyticase or chitinase was chosen. Five fungal species (*Pythium ultimum*, *Mucor mucedo*, *Penicillium camembertii*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*) belonging to different classes were selected. Results are shown in Table 3. The moderate increases in DNA yield were in the range of 5 % - 28 % which were at least significant to the control at $p = < 0.05$. Lyticase was more active on the cellulose-containing fungus *Pythium* while chitinase was mainly active on chitin-containing fungi. A combination of lyticase+chitinase in the lysis solution always reduced the DNA yield.

3.3. DNA yields with lysis protocol II

In the following approach it was attempted to further optimize and simplify the lysis protocol by testing commercially available lytic enzyme complexes. Ten fungi were chosen: the Oomycete *Pythium ultimum*, two Zygomycetes *Mortierella ramanniana* and *Mucor mucedo*, the Hyphomycete *Trichoderma viride* (class Ascomycetes) which has a teleomorphic stage, the Hyphomycete *Rhizoctonia solani* (class Basidiomycete) which has a teleomorphic stage and five Fungi imperfecti (class Ascomycetes) *Botrytis allii*, *Fusarium culmorum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicil-*

lium camembertii, *Stachybotrys chartarum* with no known sexual stage. During these investigations it became obvious that the addition of aurintricarboxylic acid (ATA), which was thought to be a specific inhibitor of nucleases during DNA extraction (Hallick et al., 1977; Marstorp and Witter, 1999), depressed the potential DNA yield drastically by 44 % (range 16 % - 95 %) in our system (Figure 3a) when data from lysis protocol I (containing ATA) and lysis protocol II (without ATA) were compared. It could be that ATA is not that specific. This observation was made by Bina-Stein and Tritton (1976), noting that ATA will inhibit most enzymes regardless of their specific catalytic functions.

The lytic enzyme complex should have chitinolytic, glucanolytic and cellulolytic properties should the lysis protocol be applied for soil DNA extractions. A vast body of literature reports on the successful use of the enzyme complex Novozym 234 (Novo Nordisk, Denmark) which was commercially produced from the fungus *Trichoderma harzianum*. The substance is today no longer available from the former manufacturer, and as an alternative Glucanex[®] was chosen, which has the same combination of β -glucanase, cellulase, protease and chitinase activities and is as well a product of *Trichoderma harzianum*. With Glucanex[®] as an enzyme amendment, seven of the ten fungi showed a positive response with small increases in DNA yields in the range of 6 % - 14 % when compared to lysis protocol II without Glucanex[®]. The increases were significant for the majority of fungi ($p = < 0.02 - 0.001$). Glucanex[®] combined with lyticase increased the DNA yield of eight fungal species even more in the range from 6 % to 24 % ($p = 0.01 - 0.001$) (Figure 3a). A summary of the DNA yield of all ten fungi is given in Figure 3b. The protocol II in combination with a Glucanex-lyticase complex gave the highest DNA yields with a mean of 6.45 $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight (range 4.2 to 8.7). *Fusarium culmorum* is the only species which did not react to these lytic enzyme amendments, however when Glucanex[®] was combined with chitinase,

there was an increase in DNA yield by > 11 %. All other fungi did not react to the Glucanex-chitinase combination, the values were either comparable to the lysis solution without lytic enzymes or similar to the Glucanex-lyticase complex or values were even decreased (not shown). It is worthy to point out that in this investigation the DNA yield did not differ very much between fungal species tested. With the exception of *Fusarium culmorum* and *Rhizoctonia solani* with DNA yields > 4.0 $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight and *Mucor mucedo* with > 5.0 $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight, all other species gave DNA yields above 6.0 $\mu\text{g mg}^{-1}$ dry weight. This may be due to the fact that the mycelium used was young and sporulation was not pronounced yet.

There were warnings that lytic enzymes could be contaminated with DNA (Loeffler et al., 1999; Rimek et al., 1999; Borst et al., 2004). In this study this was not the case since DNA contamination of any ingredient would be detected in our system by a high blank.

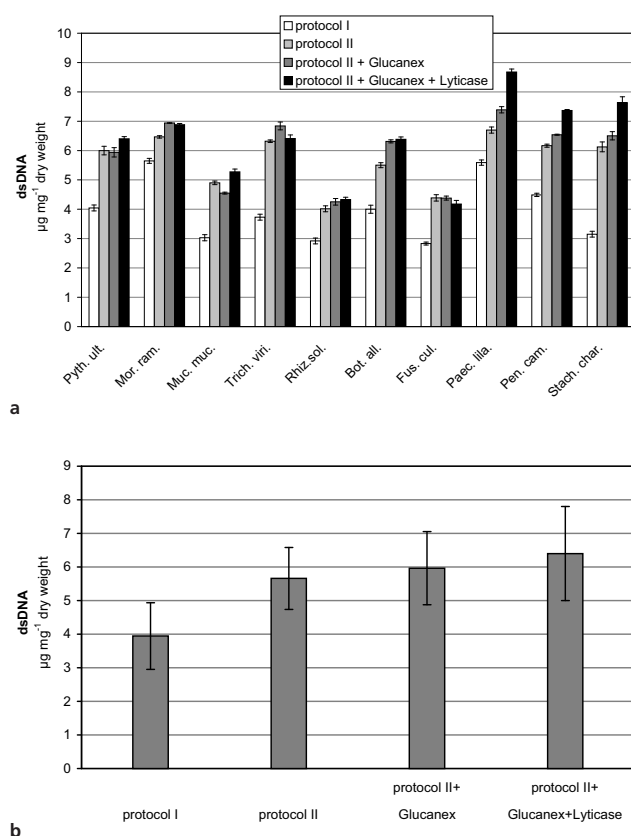


Figure 3a,b:

Contrasting dsDNA yields of ten soil fungi with respect to the lysis protocol applied

- a) Yield of individual species. Fungi were grouped according to their taxonomical status (see 3.3). Error bars = standard error. Mean DNA yields were based on at least three separate experiments with triplicate extractions and duplicate DNA determinations each. For complete species names see Table 1.
- b) Summary of DNA yields of ten fungal species as given under a). Error bars = standard deviation; significant differences in DNA yield among treatment groups were *** $p < 0.001$ or ** $p < 0.003$.

3.4. Carbon:DNA ratio

An additional useful parameter besides DNA alone is the C:DNA ratio of organisms as an index for following the nutritional status or growth of cells. This index is more commonly applied in marine science (Jones et al., 1995). Exemplarily three fungal species were analysed for their carbon content. When expressed as a percentage of the total cellular dry weight, the carbon contents for *Pythium ultimum*, *Mucor mucedo* and *Fusarium culmorum* were $44.65 \% \pm 0.12$, $42.59 \% \pm 0.36$ and $41.25 \% \pm 0.84$, respectively. With respect to the DNA yield obtained with extraction protocol II, this resulted in a C:DNA ratio of 70, 80 and 98 for *P. ultimum*, *M. mucedo* and *F. culmorum*, respectively. These C:DNA ratios are very similar to those found for marine microalgae (Jones et al., 1995).

4 Conclusions

The extraction protocol II is suitable for a high yield of DNA recovery from fungal mycelia. The yields obtained belong to the set of high DNA recoveries reported in Table 3. The procedure is relatively simple, quick (~2 h) and with the exception of SDS no poisonous ingredients are used. In recent years a number of miniaturized rapid methods were announced (Liu et al., 2000; Millar et al., 2000; Manian et al., 2001; Knoll et al., 2002; Plaza et al., 2004) for fungal DNA extractions. Unfortunately, none of those gave information on the DNA yield obtained in quantitative terms and a comparative evaluation could not be done.

The DNA yield from young fungal mycelium was in this study very much comparable between species. It amounted to less than one percent of mycelial dry weight and is nearly 10-fold lower than that seen for bacteria. Since a relationship exists between cell size and DNA contents on a dry weight basis (Christensen et al., 1995), whereby with decreasing cell size the DNA content increases (Simon and Azam 1989; Christensen et al., 1995), fungal DNA yield must be lower than that for bacteria. In this context it may be of interest to note that the range of DNA per unit biomass dry weight or Carbon:DNA ratio reported here were similar to published values for marine algae (Holm-Hansen et al., 1968; Jones et al., 1995).

Should this method be applied to DNA extraction from soil microorganisms, our original lysis protocol must be modified, omitting ATA. Cell-wall degrading enzymes such as Glucanex® in combination with lyticase should be included since they can improve DNA yields.

Acknowledgement

I wish to thank Susanne Behn, Andrea Kremling and Ute Wildschütz for their expert technical assistance and also for their total commitment.

References

- Al-Samarrai TH, Schmid J (2000) A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Lett Appl Microbiol* 30(1):3-56
- Bainbridge BW, Spreadbury CL, Scalise FG, Cohen J (1990) Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* 66:113-118
- Bajracharya R, Mudgett RE (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnol Bioeng* 22(11):2219-2235
- Balasubramanian N, Juliet GA, Srikalavani P, Lalithakumari D (2003) Release and regeneration of protoplasts from the fungus *Trichothecium roseum*. *Can J Microbiol* 49(4):263-268
- Bina-Stein M, Tritton TR (1976) Aurintricarboxylic acid is a nonspecific enzyme inhibitor. *Mol Pharmacol* 12:191-193
- Birch M, Denning DW (1998) Comparison between five lysing enzyme preparations on protoplast formation in *Aspergillus fumigatus* [online]. Zu finden in http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/laboratory_protocols/birch.htm
- Blagodatskaya E, Blagodatskii SA, Anderson T-H (2003) Quantitative isolation of microbial DNA from different types of soils of natural and agricultural ecosystems. *Microbiology* 72(6):744-749
- Borst A, Box ATA, Fluit AC (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestion for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(4):289-299
- Brock TD, Madigan MT (1991) *Biology of microorganisms*. London : Prentice-Hall, p 121
- Christensen H, Olsen RA, Bakken LR (1995) Flow cytometric measurements of cell volumes and DNA contents during culture of indigenous soil bacteria. *Microb Ecol* 29(1):49-62
- Clark G (ed) (1981) *Staining procedures*. Baltimore : Williams & Wilkins, 512 p
- Clegg CD, Ritz K, Griffiths BS (1997) Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Lett Appl Microbiol* 25(1):30-33
- De Nijs M, Nabben L, Wernars K (1996) Isolation of *Fusarium* DNA for molecular analysis with and without mechanical cell disruption. *J Microbiol Methods* 27(1):13-17
- Deshpande MV (1986) Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *J Sci Ind Res* 45(4):273-281
- Domsch KH, Gams W, Anderson T-H (1980) *Compendium of soil fungi* : vol. 1. London : Academic Press, VII, 859 p
- Dorn G, Rivera W (1966) Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 92(6):1618-1622
- Fariña JL, Molina OE, Figueroa LIC (2004) Formation and regeneration of protoplasts in *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126. *J Appl Microbiol* 96(2):254-262
- Fredricks DN, Smith C, Meier A (2005) Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 43(10):5122-5128
- Gottlieb D, van Etten JL (1964) Biochemical changes during the growth of fungi : I. Nitrogen compounds and carbohydrate changes in *Penicillium atrovirens*. *J Bacteriol* 88(1):114-121
- Griffin DW, Kellogg CA, Peak KK, Shinn EA (2002) A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. *Lett Appl Microbiol* 34(3):210-214
- Griffiths LJ, Anyim A, Doffman SR, Wilks M, Millar M, Agrawal SG, (2006) Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol* 55(9):1187-1191
- Hallick RB, Chelm BK, Gray PW, Orozco EM (1977) Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res* 4(9):3055-3064
- Hamlyn PF, Bradshaw RE, Mellon FM, Santiago CM, Wilson JM, Peberdy JF (1981) Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb Technol* 3(4):321-325
- Harris D (1994) Analysis of DNA extracted from microbial communities. In: Ritz K, Dighton J, Giller KE (eds) *Beyond the biomass : compositional and functional analysis of soil microbial communities*. Chichester : Wiley, pp 111-118
- Haugland RA, Heckman JL, Wymer LJ (1999) Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J Microbiol Methods* 37(2):165-176
- Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, Tiedje JM (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* 54(3):703-711
- Jin J, Lee Y-K, Wickes BL (2004) Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 42(9):4293-4296
- Joergensen RG, Emmerling Ch (2006) Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 169(3):295-309
- Jones DR, Karl DM, Laws EA (1995) DNA:ATP ratios in marine microalgae and bacteria : implications for growth rate estimations based on rates of DNA synthesis. *J Phycol* 31(2):215-223
- Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ (2006) An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods* 65(1):38-48
- Knoll S, Mulfinger S, Niessen L, Vogel RF (2002) Rapid preparation of *Fusarium* DNA from cereals for diagnostic PCR using sonification and an extraction kit. *Plant Pathol* 51(6):728-734
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen R (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38(1):471
- Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagmeyer L, Schmidt D, Serey F-P, Hartmann M, Eucker J, Einsele H (1999) Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol* 37(4):1200-1202
- Makino W, Cotner JB, Sterner RW, Elser JJ (2003) Are bacteria more like plants or animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C:N:P stoichiometry. *Funct Ecol* 17(1):121-130
- Manian S, Sreenivasaprasad S, Mills PR (2001) DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Lett Appl Microbiol* 33 (4):307-310
- Marstorp H, Witter E (1999) Extractable dsDNA and product formation as measures of microbial growth in soil upon substrate addition. *Soil Biol Biochem* 31(10):1443-1453
- Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JAP (2000) A simple sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods* 42(2):139-147
- More MI, Herrick JB, Silva MC, Ghiorse WC, Madsen EL (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl Environ Microbiol* 60(5):1572-1580
- Müller FMC, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ (1998) Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol* 36(6):1625-1629
- Neidhardt FC (1987) Chemical composition of *Escherichia coli*. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli and salmonella typhimurium : cellular and molecular biology*. Washington, DC : Am Soc Microbiol, pp 3-6
- Ogram A (2000) Soil molecular microbial ecology at age 20 : methodological challenges for the future. *Soil Biol Biochem* 32(11-12):1499-1504
- Ogram A, Sayler GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of micro-

- bial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7(2-3):57-66
- Pirt SJ (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Oxford : Blackwell, X, 274 p
- Plaza GA, Upchurch R, Brigmon RL, Whitman WB, Ulfig K (2004) Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Pol J Environ Stud* 13(3):315-318
- Punekar NS, Suresh Kumar SV, Jayashri TN, Anuradha R (2003) Isolation of genomic DNA from acetone-dried *Aspergillus* mycelia. *Fungal Genet Newsl* 50:15-16
- Raeder U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1(11):17-20
- Ramirez-Martinez JR (1970) Growth curves and nucleic acids content of mycelial and yeast-like forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol Mycol Appl* 41(3-4):203-210
- Reeleder RD, Capell BB, Tomlinson LD, Hickey WJ (2003) The extraction of fungal DNA from multiple large soil samples. *Can J Plant Pathol* 25(2):182-191
- Rimek D, Garg AP, Haas WH, Kappe R (1999) Identification of contaminating fungal DNA sequences in Zymolyase. *J Clin Microbiol* 37(3):830-831
- Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM, Simonet P (2003) Extraction of DNA from soil. *Eur J Soil Biol* 39(4):183-190
- Sandaa R-A, Enger Ø, Torsvik V (1998) Rapid method for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biol Biochem* 30(2):265-268
- Saylor GS, Nikbakht K, Fleming JT (1992) Application of molecular techniques to soil biochemistry. In: Stotzky G, Bollag J-M (eds) *Soil biochemistry* : vol. 7. New York : Dekker, pp 131-172
- Simon M, Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of marine bacteria. *Mar Prog Ser* 51:201-213
- Specht CA, DiRusso CC, Novotny CP, Ullrich RC (1982) A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem* 119(1):158-163
- Stouthamer AH (1973) A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek* 39(3):545-565
- Tanaka K, Miyazaki T, Maesaki S, Mitsutake K, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Hossain MA, Tashiro T, Kohno S (1996) Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 34(11):2826-2828
- Tien CC, Chao CC, Chao WL (1999) Methods for DNA extraction from various soils : a comparison. *J Appl Microbiol* 86(6):937-943
- Tsai K-P, Calza RE (1992) Enzyme-based DNA extraction from zoospores of ruminal fungi. *Fungal Genet Newsl* 39:86-88
- van Burik J-AH, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D (1998) Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* 36:299-303
- Watts HJ, Véry A-A, Perera THS, Davies JM, Grow NAR (1998) Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144:689-695
- Winton LM, Stone JK, Watrud LS, Hansen EM (2002) Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 92(1):112-116
- Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, Osumi M (2002) Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 55(4):122-125

Beef production in Germany - production systems and their spatial distribution

Claus Deblitz*, Julia Brömmer** and Daniel Brüggemann***

Summary

This paper provides an overview of the spatial distribution of cattle, based on regional statistics as well as a systematic analysis of beef finishing systems in Germany and their spatial distribution, based on own expert surveys.

Total cattle numbers have gone down in the last 15 years, mainly due to the decline of dairy cows. The most important regions for dairy cows, in both absolute terms and cow density, are Bavaria, Lower Saxony and North-rhine-Westphalia. The regions with the highest density of suckler-cows appear complementary to the dairy regions. This holds especially true for Bavaria and East Germany. Only 13 percent of the total cow numbers are suckler-cows. This means that most of the beef produced in Germany originates from dairy herds.

The main beef finishing system in Germany is bull finishing based on Holstein and Fleckvieh animals of different ages at start - calves, starters, store cattle (all from dairy cows) and weaners (from suckler-cows). Animals are typically kept in cubicle sheds with slatted floors, fed on a corn and/or grass silage basis and supplemented with concentrates, grains, soybean meal as well as by-products of the food industry. Thus, many systems are located in areas where corn growing is profitable. The highest density of finishing bulls and the production systems mentioned are found in a band throughout Centre-South Bavaria and in the Northwest of Germany.

Finishing of steers and heifers only exists in isolated cases and areas and is usually linked to a specific marketing programme to be profitable. Further meat types produced are rosé calves and veal from calves, both of which are rather restricted to specific areas in North and West Germany and one county in East Germany.

The paper could not close all information gaps, especially about the spatial distribution of the systems. The present changes in framework conditions (policy, prices, bio-energy) make an update in due time reasonable.

Keywords: *Germany, Beef production, Production systems, spatial distribution*

Zusammenfassung

Rindfleischproduktion in Deutschland - Produktionssysteme und räumliche Verteilung

Dieser Beitrag gibt auf der Basis von Regionalstatistiken einen Überblick über die räumliche Verteilung der Rinderbestände sowie auf der Basis von Expertenbefragungen eine systematische Analyse von Produktionssystemen der Rindermast und ihrer räumlichen Verteilung in Deutschland.

Der Rinderbestand ist in den letzten 15 Jahren vorwiegend aufgrund des Rückgangs der Zahl der Milchkühe gesunken. Die Regionen mit der höchsten Zahl und der höchsten Dichte an Milchkühen sind Bayern, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen. Die Regionen mit der größten Mutterkuhdichte sind zu den Milchregionen größtenteils komplementär, vor allem in Bayern und Ostdeutschland. Nur 13 Prozent der Kühe in Deutschland sind Mutterkühe, d.h. dass der überwiegende Teil der Rindfleischproduktion aus der Milchviehhaltung stammt.

Bullenmast ist das wichtigste Produktionssystem in Deutschland und basiert auf den Rassen Holstein und Fleckvieh, die als Kälber, Starter, Fresser (aus der Milchviehhaltung) und Absetzer (aus der Mutterkuhhaltung) aufgestellt werden. Die Tiere werden typischerweise in Laufställen auf Spaltenboden gehalten und mit Mais- und/oder Grassilage plus Kraftfutter, Getreide, Sojaschrot sowie Nebenprodukten der Nahrungsmittelindustrie gemästet. Daher befinden sich viele dieser Systeme in Gebieten, in denen der Anbau von Mais rentabel ist. Die größte Dichte von Mastbullen befindet sich in einem Band im Zentrum Bayerns sowie im Nordwesten Deutschlands.

Ochsen- und Färsenmast wird nur vereinzelt und regional eingeschränkt betrieben und ist normalerweise mit einem speziellen Vermarktungsprogramm kombiniert. Weitere Fleischarten sind die Rosékälber sowie weißes Kalbfleisch. Beide Produktionssysteme sind räumlich auf den Norden und Westen Deutschlands und einen Kreis in Ostdeutschland beschränkt.

Der Beitrag kann nicht alle Informationslücken schließen, insbesondere hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Systeme. Dies und die Änderung der Rahmenbedingungen (Politik, Preise, Bioenergie) lassen eine Aktualisierung in absehbarer Zeit sinnvoll erscheinen.

Schlüsselwörter: *Deutschland, Rindfleischproduktion, Produktionssysteme, räumliche Verteilung*

* Asian Agribusiness Research Centre, Charles Sturt University, Orange, 2800 NSW/Australia; Email: claus.deblitz@vti.bund.de

** Osterstraße 55, 30159 Hannover/Germany

*** Johann Heinrich von Thünen-Institut, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Institute of Farm Economics, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig/Germany

1 Introduction

1.1 Situation and objectives

With framework conditions for agriculture changing significantly, changes in production systems as well as regional shifts of livestock production are likely to occur in the future. As far as beef production systems are concerned, literature analysis and initial expert interviews revealed that analysis of beef production systems and their spatial distribution in Germany was rather limited and scattered. Most of the information available came from regional or state-wide extension services, breeding or cattle marketing organisations or from textbooks referring to beef production (Wiedenmann et al., 1999; Matzke et al., 1995; Pflaum et al., 1992; Geissler et al., 1984; Bogner, 1978). Consequently, it was decided to carry out an initial project to address this issue and close existing information gaps. Due to the lack of literature and statistics, it very soon became clear that an expert-based approach would best serve the needs and at the same time reflecting the time and financial constraints.

The goals of this paper are to:

- analyse the spatial distribution of different cattle categories and the herd structures in Germany,
- define and describe the prevailing production systems of beef in Germany, and
- to analyse the spatial distribution of these production systems in Germany.

1.2 Data base and methods

Statistics available from the 2003 livestock survey (Vieh-zählung) of the German Statistical Office were used to analyse the development and the spatial distribution of cattle in Germany as well as the herd size structure presented in Chapter 2. They are the latest data available to the degree of detail required. Whenever more up-to-date figures of single data were available, they were included in the analysis.

The classification and analysis of the production systems in this paper stem from the diploma thesis written by Brömmer (2005). They follow the concept of typical farms and production systems applied in the **agri benchmark** project and described in detail by Deblitz and Zimmer (2005). The main reason for choosing the typical farm concept is that a representative survey of individual farms was impossible to carry out within the scope of the study and its time and financial limitations.

Instead, an expert survey was carried out to obtain the required production system information, addressing staff

from extension, regional agricultural administrations as well as researchers. The approach and procedure of the survey can be summarised as follows:

- Regions were defined as administrative regions such as the German federal states or the next lower administrative units, district and county. All German federal states except the city-states Hamburg, Bremen and Berlin were covered, adding up to a total of 13 regions.
- The regional experts were asked to provide the data and information characterising typical beef finishing systems in their region. For this purpose, a number of existing production systems were defined and specified together with the experts (see Chapter 3).
- For the subsequent survey, a standardised questionnaire was used after being pretested with a selected group of experts. The experts were then advised personally or per telephone on how to fill the questionnaire.
- In a first step, the experts were asked to specify the dominating/prevaling systems in the region, measured by their share in total beef production. A quantitative definition of a minimum share in total production was, however, not provided, for example a share of at least 20 percent in regional beef production for a specific system. The reasons were a) a lack of regionalized and production system related data (which was one reason to conduct the study) and b) the authors did not want to jeopardise the success of the survey nor significantly reduce its output by imposing an additional task of assessment on the experts.
- It was clear from the beginning that some of the production systems would probably not reach a significant share in total production in any of the regions (for example steer production). Consequently, in the second step it was asked how important these systems were in a national comparison. Taking steer production as an example, the question was to estimate the share of the regional steer production in the total German production. If experts assessed this system to be relevant for the national production, it was specified. Again, no quantitative thresholds were set for the reasons quoted above.
- Once the production systems were specified, the experts were asked to assign each production system to the administrative regions (counties or districts). As production systems typically do not change in line with administrative borders, the experts were additionally asked to refer the production systems identified to natural regions.
- The selection of production systems and their assignment to regions reveal a certain weakness which, however, was found acceptable in this first step. In further surveys, more refined approaches might be taken (see also Chapter 5).

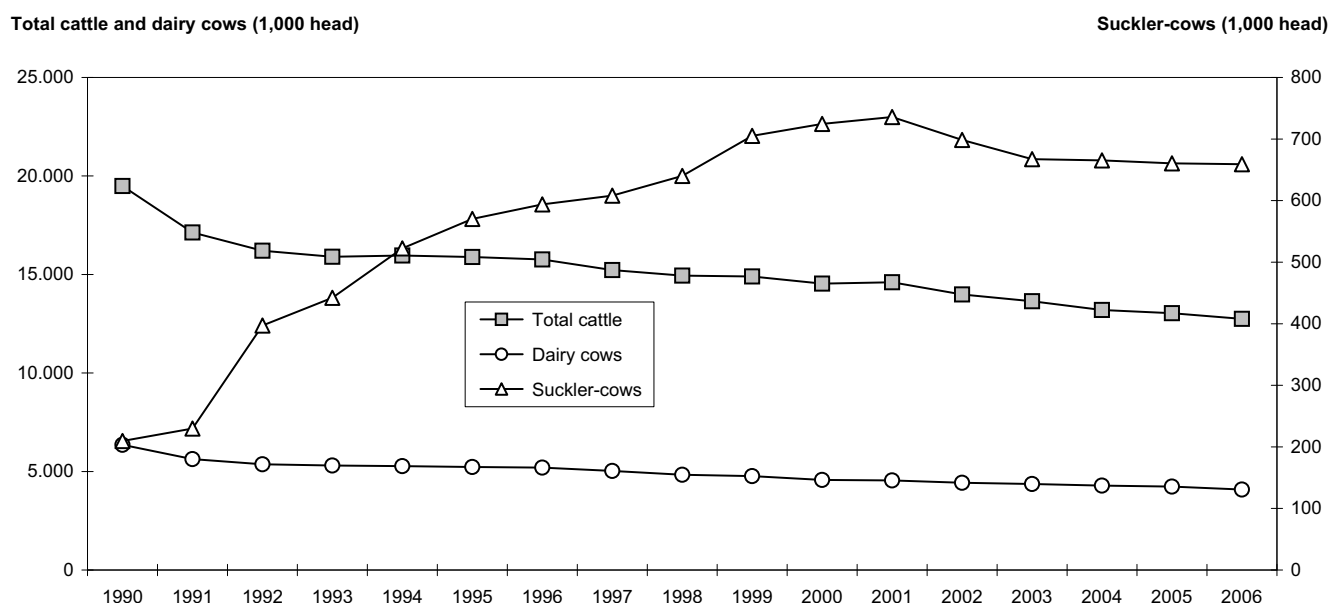


Figure 1:

Development of the cattle and cow numbers in Germany 1990 - 2006 (1,000 head) (Statistisches Bundesamt, 2003)

1.3 Working steps

Chapter 2 provides an overview about the development and the spatial distribution of cattle inventories in Germany. The definition of production systems used in this paper is provided in Chapter 3. Chapter 4 presents the main characteristics of the production systems in Germany as well as an overview of their spatial distribution. Chapter 5 eventually draws some conclusions on the findings and further steps.

2 Development and spatial distribution of cattle inventories in Germany

The following chapter provides an overview about the development of the cattle numbers in Germany since the reunification, as well as their spatial distribution and average cattle numbers per farm based on the livestock census from the year 2003. The overview starts with total cattle, followed by dairy and suckler- and nurse-cows¹, male cattle of > 1 year (finishing bulls), and is completed with calves.

2.1 Total cattle

Figure 1 shows the development of the cattle and cow numbers in Germany from 1990 to 2006. All years re-

flect Germany East and West after the reunification. The suckler-cow numbers are reflected on the second y-axis, displayed at the right hand side of the chart.

The figure shows that from 1990 to 2006, the cattle numbers decreased by almost one third with a particularly sharp drop in the first years after the reunification, when many farms in East Germany gave up dairy and beef production. The decline is mainly caused by the decline in dairy cows and the corresponding downturn in female progeny and finishing bulls coming from the dairy herd. The increase in suckler-cow numbers could not stop this trend as it came from a very low basis and has now reached approximately 13 percent of the total cow numbers. With the present policy settings, it can not be expected that suckler-cow numbers increase medium-term.

Corresponding to the decrease of the cattle numbers, beef production fell from more than 1.8 million tons in the beginning of the nineties to 1.2 million tons in 2006 (ZMP, 2007). The latest developments in inventories and beef production were mainly caused by the CAP-reform 2003 implemented starting in 2005, resulting in a drop of cattle numbers.

Table 1 shows the spatial distribution of the total cattle numbers to the federal states as well as the average farm sizes of farms with cattle. It should be noted that these farm sizes are larger now according to the structural change taking place. The total cattle numbers in 2003 were approximately 13.6 million head (down to 12.8 million in 2006). Of these, West Germany has more than 80 percent and Bavaria as the biggest cattle producing region, Lower Saxony and Northrhine-Westphalia together kept almost

¹ Nurse-cows are cows raising more than one calf. Due to their small number, and the fact that statistics often do not state them separately, suckler- and nurse-cows are further referred to as suckler-cows

Table 1:

Total cattle, number of farms and average inventory per farm by federal state 2003 (Statistisches Bundesamt, 2003)

	Animals		Farms		Average Inventory
	Number	Share in %	Number	Share in %	
Schleswig-Holstein	1,236,647	9.1	10,228	5.2	121
Hamburg	7,129	0.1	145	0.1	49
Lower Saxony	2,661,117	19.5	28,805	14.5	92
Bremen	11,283	0.1	129	0.1	87
Northrhine-Westphalia	1,418,812	10.4	22,865	11.5	62
Hesse	504,770	3.7	12,081	6.1	42
Rhineland-Palatinate	410,455	3.0	7,196	3.6	57
Baden-Wuerttemberg	1,138,310	8.3	26,351	13.3	43
Bavaria	3,763,833	27.6	74,685	37.7	50
Saarland	58,460	0.4	930	0.5	63
<i>West Germany</i>	<i>11,210,816</i>	<i>82.2</i>	<i>183,415</i>	<i>92.6</i>	<i>61</i>
Berlin	405	0.0	9	0.0	45
Brandenburg	614,337	4.5	3,084	1.6	199
Mecklenburg-W. Pomerania	565,079	4.1	2,480	1.3	228
Saxony	521,603	3.8	4,496	2.3	116
Saxony-Anhalt	364,581	2.7	1,962	1.0	186
Thuringia	366,882	2.7	2,620	1.3	140
<i>East Germany</i>	<i>2,432,887</i>	<i>17.8</i>	<i>14,651</i>	<i>7.4</i>	<i>166</i>
Germany	13,643,703	100.0	198,066	100.0	69

Table 2:

Dairy cows, number of farms and average inventory per farm by federal state 2003 (Statistisches Bundesamt, 2003)

	Animals		Farms		Average Inventory
	Number	Share in %	Number	Share in %	
Schleswig-Holstein	357,733	8.2	6,268	5.2	57
Hamburg	1,087	0.0	29	0.0	37
Lower Saxony	748,056	17.1	17,218	14.2	43
Bremen	3,384	0.1	70	0.1	48
Northrhine-Westphalia	391,607	9.0	10,497	8.6	37
Hesse	161,561	3.7	5,610	4.6	29
Rhineland-Palatinate	126,587	2.9	3,255	2.7	39
Baden-Wuerttemberg	398,290	9.1	16,388	13.5	24
Bavaria	1,326,612	30.3	56,717	46.7	23
Saarland	14,801	0.3	337	0.3	44
<i>West Germany</i>	<i>3,529,718</i>	<i>80.7</i>	<i>116,389</i>	<i>95.8</i>	<i>30</i>
Berlin	123	0.0	3	0.0	41
Brandenburg	181,472	4.2	899	0.7	202
Mecklenburg-W. Pomerania	182,210	4.2	1,019	0.8	179
Saxony	208,582	4.8	1,510	1.2	138
Saxony-Anhalt	142,891	3.3	854	0.7	167
Thuringia	126,962	2.9	850	0.7	149
<i>East Germany</i>	<i>842,240</i>	<i>19.3</i>	<i>5,135</i>	<i>4.2</i>	<i>164</i>
Germany	4,371,958	100.0	121,524	100.0	36

58 percent of Germany's total cattle.

In 2003 there were almost 200,000 farms keeping cattle in Germany, of which less than 10 percent could be found in East Germany. Approximately 121,500 of these farms kept dairy cows (see Table 2) and 50,500 kept suckler-cows.

Average herd size was 69 (and up to 74 in 2006), ranging from 43 in Baden-Wuerttemberg to 228 in Mecklenburg-Western Pomerania. There is a clear North-South and West-East divide in herd sizes and the two biggest regional herd sizes in West Germany (Schleswig-Holstein and Lower Saxony) are still smaller than herd sizes in most of the

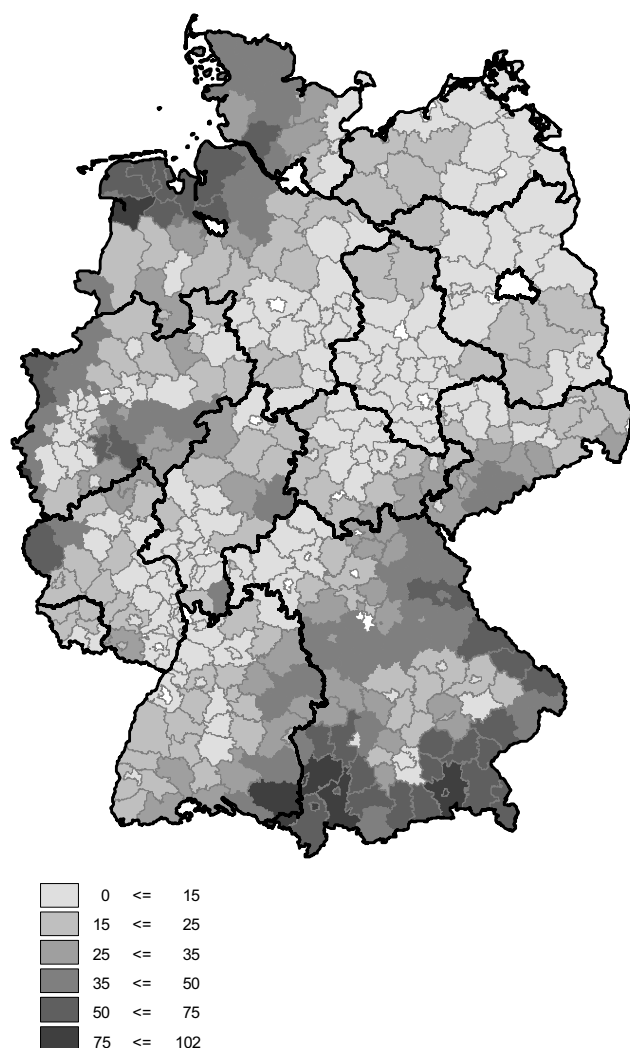
East German federal states. Compared to these figures, in 1998 average herd sizes were smaller: 53 cattle in West Germany and 106 cattle in East Germany (Wiedenmann, 1999). According to Statistisches Bundesamt (German Statistics Office) (2007), in 2005 approximately 60 percent of the total cattle (and 21 percent of the farms) could be found in herd sizes above 100 cattle.

2.2 Dairy cows and suckler-cows

In 2003, the total number of **dairy cows** in Germany was almost 4.4 million head. In 2007, this number has decreased to 4.08 million (ZMP, 2007). Bavaria clearly leads the list with more than 1.3 million dairy cows, more than all of East Germany, representing around 30 percent of all dairy cows. In East Germany, approximately 20 percent of the German dairy cows are found on less than five percent of the farms.

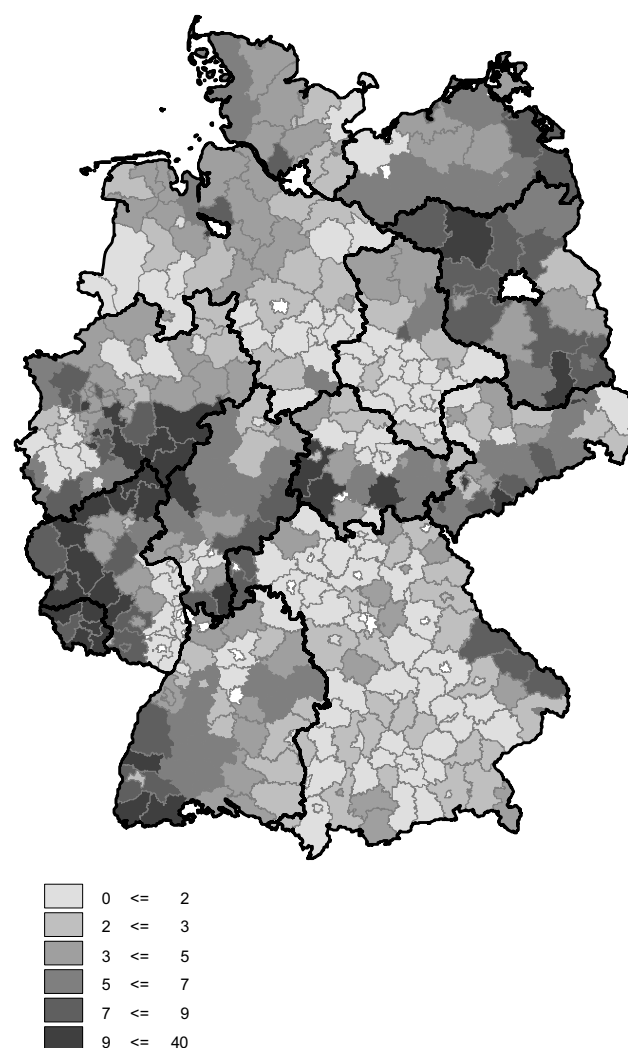
The average herd size was just 36 dairy cows (and up to 40 cows in 2006), again revealing significant North-South and West-East differences. Average herd sizes in East Germany were more than five times higher than in West Germany and around three times higher than in Schleswig-Holstein which has the highest average herd sizes in West Germany. On the other hand, Bavaria and Baden-Wuerttemberg had average herd sizes of less than 25 cows. According to Statistisches Bundesamt (2007), in 2005 approximately 26 percent of the dairy cows (and 4.5 percent of the farms) could be found in herd sizes above 100 cows.

Map 1 shows the regional dairy cow density in Germany, measured in *number of dairy cows per 100 ha agricultural area (AA)*. This reference unit has been taken for all animal categories analysed here as a) it makes counties of different size comparable and b) it yields basically the



Source: Statistisches Bundesamt, 2003

Map 1:
Dairy cows per 100 ha agricultural area 2003



Source: Statistisches Bundesamt, 2003

Map 2:
Suckler-cows per 100 ha agricultural area 2003

Table 3:

Suckler cows, number of farms and average inventory per farm by federal state 2003 (Statistisches Bundesamt, 2003)

	Animals		Farms		Average Inventory
	Number	Share in %	Number	Share in %	
Schleswig-Holstein	42,374	6.3	2,677	5.3	16
Hamburg	1,117	0.2	74	0.1	15
Lower Saxony	73,508	10.8	5,809	11.5	13
Bremen	703	0.1	41	0.1	17
Northrhine-Westphalia	68,148	10.1	6,445	12.8	11
Hesse	41,339	6.1	4,549	9.0	9
Rhineland-Palatinate	48,161	7.1	3,479	6.9	14
Baden-Wuerttemberg	63,219	9.3	7,905	15.6	8
Bavaria	74,214	10.9	10,941	21.7	7
Saarland	8,363	1.2	539	1.1	16
<i>West Germany</i>	<i>421,146</i>	<i>62.1</i>	<i>42,459</i>	<i>84.0</i>	<i>10</i>
Berlin	69	0.0	5	0.0	14
Brandenburg	91,676	13.5	1,823	3.6	50
Mecklenburg-W. Pomerania	67,639	10.0	1,268	2.5	53
Saxony	36,169	5.3	2,556	5.1	14
Saxony-Anhalt	24,661	3.6	931	1.8	26
Thuringia	36,519	5.4	1,488	2.9	25
<i>East Germany</i>	<i>256,733</i>	<i>37.9</i>	<i>8,071</i>	<i>16.0</i>	<i>32</i>
Germany	677,879	100.0	50,530	100.0	13

same results as referring the animal numbers to the total land area.

The map clearly shows the concentration of dairy cows in areas with a relatively high share of productive/intensive grassland as well as in regions with good growing conditions for corn silage. These regions are found in the Allgaeu, pre-alpine lowland areas, Bavarian Forest and the North West German (coastal) marshlands. In some of these areas the dairy cow density reaches more than 75 cows per 100 ha AA.

Table 3 shows the distribution of the **suckler-cow** numbers by the federal states and Map 2 provides the picture of the suckler-cow density on county level.

The total suckler-cow number in Germany is well below 700,000 head, in other words, the proportion of suckler-cows in total cow numbers is approximately 13 percent. Germany can therefore be classified as a 'dairy country' where most of the beef produced is of dairy origin.

Approximately two thirds of the suckler-cows and 85 percent of the farms keeping suckler-cows can be found in West Germany. Similar to dairy, Bavaria, Lower Saxony, Northrhine-Westphalia and Baden-Wuerttemberg have the highest inventories of between 63,000 to 74,000 animals, albeit with Bavaria being significantly less dominant. Furthermore, and contrary to dairy, the relative importance of East Germany is much higher for suckler-cows. East Germany represents one third of the cows and 16 percent of the farms keeping suckler-cows. This is also reflected in the fact that Brandenburg is the region with the high-

est number of suckler-cows in Germany, and Mecklenburg can be found in the top group of suckler-cow inventories.

A view on the farm sizes reveals differences between the average herd sizes in East (32 suckler-cows) and West Germany (10 suckler-cows). Surprisingly, the East-West difference is much smaller compared to the dairy farms. The reason is likely to be that also in East Germany many smaller farms with marginal grassland decided to keep suckler-cows at times when the additional suckler-cow quota allocated to East Germany was not yet exhausted. The highest average herd sizes, with around 50 suckler-cows, are found in Mecklenburg and Brandenburg. The smallest average herd sizes with less than 10 suckler-cows are found in Bavaria and Baden-Wuerttemberg. According to the Statistisches Bundesamt (2007), in 2005 approximately 23 percent of the total cattle (and 1.2 percent of the farms) could be found in herd sizes above 100 suckler-cows. This is a very high concentration of suckler-cows in a few farms. One reason is that the three biggest suckler-cow farms in Europe are located in East Germany (Brömmmer, 2005).

Further analysis showed that the average herd size in Germany remains unchanged at around 13 cows per farm when comparing 1999 and 2003. In some parts of the country (Bavaria, Thuringia) the average herd size even went down slightly (by two animals per farm), whereas in most of the East German farms, herd sizes went up between six and 14 animals per farm (Statistisches Bundesamt, 1999, 2003)

When it comes to the suckler-cow density per 100 ha agricultural land, Map 2 shows that the distribution of suckler-cows in many areas is basically complementary to the dairy cow distribution. This means that suckler-cows are mainly kept in areas where grassland is not yielding enough to feed dairy cows and vice versa. This holds particularly true for the South and the East of the country, mainly in the Northeast and very East of Germany where light soils prevail. Areas where both the density of dairy cows and suckler-cows are low are mainly the cash crop regions in Lower Saxony, Brandenburg, Northwest Bavaria and the Cologne-Aachen basin in the very West of the country.

2.4 Male cattle > 1 year

Male cattle > 1 year is the only statistical indicator found in the German statistics that provides an insight into the number of cattle on feed or kept for finishing. The reasons are that a) the majority of the animals kept for the purpose of finishing are bulls (and not heifers), b) at the age of more than 1 year male calves (for veal production) can be excluded from the figure, c) the majority of the bulls come from the dairy herd and d) breeding bulls are negligible in the dairy herd which mainly operates with artificial insemination. Consequently, male cattle > 1 year provide a reasonable indicator for the spatial distribution of beef finishing in Germany.

In 2003, there was a total of approximately 1.3 million male cattle > 1 year in Germany. Out of these, ten percent were more than two years old. Table 4 shows that 90 percent of these animals live in West Germany. This figure is even higher than the share of dairy cows in West Germany because male cattle are transferred from East Germany to West Germany for finishing. Lower Saxony has the highest share in the total of these cattle (27 percent), followed by Bavaria, Northrhine-Westphalia and Schleswig-Holstein.

The data related to the farm numbers are from the year 1999 because after this the data was only available from the Statistical Office at prohibitively high cost. This means that for calculation of average farm sizes both the livestock and the farm numbers from the year 1999 are displayed. We estimate that the average farm sizes are currently 20 percent higher.

When comparing the average herd sizes, similar to the suckler-cow inventories, there is hardly any difference between West (10 cattle) and East Germany (17 cattle). 20 bulls per farm is the maximum number found (in Brandenburg and Saxony Anhalt). Further analysis showed that the regions with a high density of finishing bulls coincide with above average farm sizes, reaching between 2 and 5 times the regional averages.

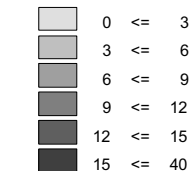
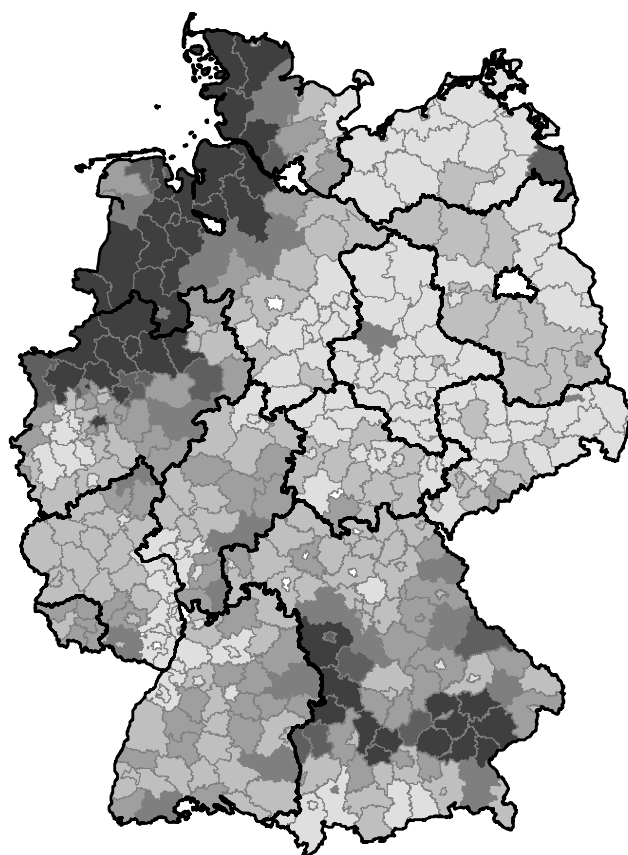
Map 3 additionally shows that measured in terms of cattle density, the finishing business has clear foci in Germany. These are in the West and Centre-South of Bavaria, the North West of Northrhine-Westphalia and in a band reaching throughout the West of Lower Saxony and

Table 4:

Male cattle > 1 year, number of farms and average inventory per farm by federal state 2003 (Statistisches Bundesamt, 2003)

Note: Farm and herd size numbers are from 1999 (explanations see text)

	Animals		Farms		Average Inventory
	Number	Share in %	Number	Share in %	
Schleswig-Holstein	134,300	10.1	8,078	6.6	17
Hamburg	1,435	0.1	96	0.1	13
Lower Saxony	365,183	27.4	20,971	17.2	17
Bremen	1,212	0.1	95	0.1	15
Northrhine-Westphalia	207,564	15.6	15,109	12.4	15
Hesse	42,462	3.2	7,977	6.5	6
Rhineland-Palatinate	30,151	2.3	5,534	4.5	6
Baden-Wuerttemberg	91,029	6.8	17,370	14.3	6
Bavaria	311,858	23.4	37,117	30.5	9
Saarland	5,337	0.4	772	0.6	8
<i>West Germany</i>	<i>1,190,531</i>	<i>89.2</i>	<i>113,119</i>	<i>92.9</i>	<i>11</i>
Berlin	28	0.0	7	0.0	7
Brandenburg	39,537	3.0	2,303	1.9	20
Mecklenburg-W. Pomerania	37,040	2.8	1,650	1.4	19
Saxony	22,176	1.7	2,307	1.9	11
Saxony-Anhalt	21,965	1.6	1,103	0.9	20
Thuringia	22,695	1.7	1,310	1.1	18
<i>East Germany</i>	<i>143,441</i>	<i>10.8</i>	<i>8,680</i>	<i>7.1</i>	<i>17</i>
Germany	1,333,972	100.0	121,799	100.0	12



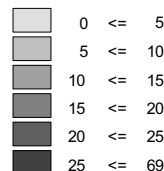
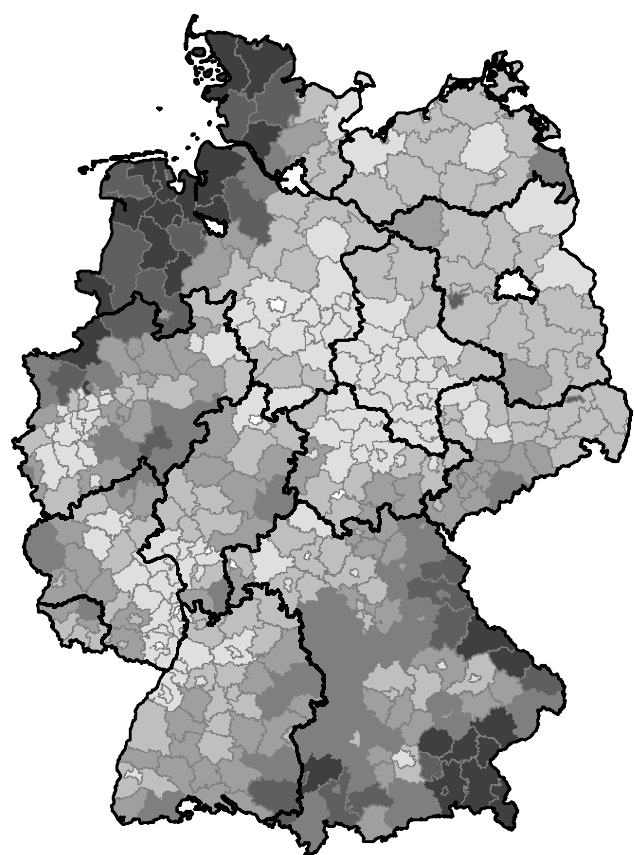
Source: Statistisches Bundesamt, 2003

Map 3:

Male cattle > 1 year per 100 ha agricultural area 2003

Schleswig-Holstein. In these areas, cattle density goes beyond 15 cattle per 100 ha. This figure seems to be relatively high but is still low when compared with the highest dairy cow densities shown in Map 1.

In East Germany, there are two counties displaying a relatively high cattle density. These are the Boerdekreis at the Western border of Saxony-Anhalt with Lower Saxony and the county Uecker-Randow in the very Northeast bordering Poland. In both counties one single huge feedlot operation stands behind these figures. In the meantime, the feedlot in the Boerdekreis was converted into a pig production unit when direct payments for cattle were decoupled in 2005, whereas the feedlot in the Northeast is still operational, finishing approximately 15,000 bulls and 20,000 calves per year.



Source: Statistisches Bundesamt, 2003

Map 4:

Calves < 6 months per 100 ha agricultural area 2003

2.5 Calves

In 2003, there were approximately 2.1 million calves of less than 6 months of age registered. With the decrease in dairy cow numbers, this figure should be approximately 7 percent lower in 2006.

Map 4 shows the density of calves (below 6 months) per 100 ha agricultural area. High calf densities are found in regions with the following characteristics:

- regions where many dairy cows are found and replacement heifers are needed, for example Schleswig-Holstein, North of Lower Saxony and Bavaria.
- regions where calf finishing is common and where calves are 'imported' from other regions (see also Chapter 4). These regions are mainly the Southwest of Lower

Saxony as well as the North East county Uecker-Randow (see Chapter 2.4).

3 Definition and specification of production systems

A finishing production system was defined a system in which animals are **exclusively** kept for producing an animal for slaughter. This definition excludes cull cows, heifers and bulls from the dairy and suckler-cow herds.

Based on a literature survey and interviews with selected advisors, short names for the production systems were defined using the final product (for example bulls, heifers, calves) plus the age of the animals at the start of finishing. The result is for example 'Bulls from calves'. Details are provided in Chapter 4.

Based on these short names, the set of variables to describe each production system comprises:

- *Location*: Allocates the production system to a county (Kreis) as well as to a natural region.
- *Combination with other enterprises*: Average number of animals and the typical combination with other enterprises, for example milk or cash crop production.
- *Animals*: Breeds used, origin of animals from dairy or suckler-cows and percentage shares of purchase and own raising of animals entering the finishing production.

- *Performance data*: Duration of finishing period, ages and weights at start and end of finishing, daily weight gain, carcass weight, stocking rates.
- *Husbandry system*: Pasture and/or confined systems, type of barn, manure system and size of finishing groups.
- *Feeding*: Forage base, own produced and purchase feed.
- *Sale channels*: Animals for slaughter or further finishing, domestic market or export.
- *Other*: Special remarks on production systems, general situation of beef finishing in the regions.

The finishing period is the time between start and end of finishing and is defined as follows:

- *Start of finishing*: For purchase animals, the day of purchase is the first day of finishing. For animals from the own dairy herd, the finishing period starts at day 14, for animals from the own suckler-cow herd at the day of weaning.
- *End of finishing*: This is the day of sale.

4 Characteristics of production systems

Table 5 shows the production systems identified and the main indicators used for identification. The two most important characteristics to distinguish the different systems

Table 5:
Indicators of beef finishing systems in Germany (Brömmer, 2005)

			Age at start days	Weight at start kg live weight	Age at end days	Weight at end kg live weight
1	Bulls from calves	Core values	14 - 21	55 - 70	545 - 640	590 - 670
		Full range		(45 - 70)	(480 - 700)	(540 - 710)
2	Bulls from starters	Core values	40 - 80	80 - 105	525 - 590	675 - 700
		Full range	(28 - 90)	(65 - 120)	(495 - 620)	(650 - 720)
3	Bulls from stores/backgrounders	Core values	135 - 155	190 - 200	595 - 670	615 - 695
		Full range	(120 - 165)	(180 - 210)	(540 - 750)	(570 - 740)
4	Bulls from weaners	Core values	220 - 290	245 - 350	530 - 665	615 - 695
		Full range	(180 - 330)	(200 - 400)	(475 - 720)	(610 - 720)
5	Steers	Core values	260 - 280	290 - 300	680 - 700	590 - 600
		Full range	(240 - 300)	(290 - 300)	(660 - 720)	(580 - 660)
6	Stores/backgrounders production	Core values	35	80	120 - 150	190 - 200
		Full range	(28 - 56)	(65 - 95)	(100 - 165)	(180 - 210)
7	Rosé calves from calves/starters	Core values	35 - 65	65 - 100	280 - 290	390 - 410
		Full range	(14 - 85)	(45 - 120)	(270 - 300)	(380 - 420)
8	Calf production (white veal meat)	Core values	14	45 - 50	170	245 - 250
		Full range			(165 - 175)	
9	Bulls from pasture	Core values	14	45	300 - 335	385 - 405
		Full range			(270 - 360)	(365 - 425)
10	Bulls concentrate finishing	Core values	85 - 240	110 - 185	555 - 560	695 - 710
		Full range	(40 - 210)		(540 - 570)	(680 - 720)

are the final product and the age of the animals at the begin of the finishing period². Under these headers, different characteristics and variations in production parameters could be found which are explained in the following.

Data shown here may differ from those used and recommended in extension service. The reason is that figures here are intended to reflect typical (real) situations instead of ideal situations. For each indicator, two ranges of figures are provided: a) the core values represent the range in which the majority of the figures for each production system can typically be found; b) the figures in brackets below the core values show the full range of all figures obtained for this production system. Further, the core values are rounded to the next five. The following text refers to the core values only.

The table shows that the majority of the finishing systems produce bulls as the final product. Steers, rosé-calves and white veal calves are the other finished products. Store/backgrounder cattle were included in this list despite the fact that they do not produce the final product (meat) but because they are part of the fattening/finishing process. Unlike for example in France, cow and heifer finishing can not be considered as a separate enterprise in the German beef industry. Heifers are typically taken straight from the cow herds as cull animals to slaughter.

Bulls are the major animal category in Germany's beef finishing industry. According to the individual farm conditions, the finishing is undertaken more or less intensively. Farms with corn silage, beef breeds and/or Fleckvieh (also referred to as Simmental) feed the animals with ad libitum corn silage plus concentrates, grains and soybean meal to achieve high daily weight gains. Farms having breeds with less growth potential (like Holstein cattle) usually feed less concentrates and a higher share of forage, consisting not just of corn silage, but also of grass silage and hay. Higher proportions of concentrates and grains are only given at the end of the finishing period.

4.1 Bulls from (dairy) calves

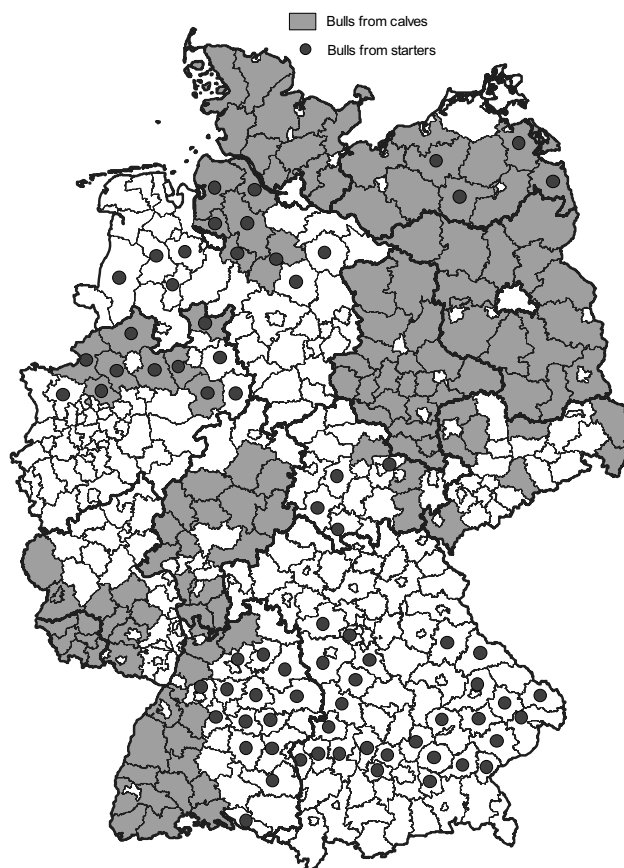
This system is characterised by a relatively low age at start which is on average 14 days. The system has the longest finishing period. Bulls from calves clearly demonstrate the link between milk production and beef finishing in Germany. In 12 out of 13 regions analysed, bulls from calves are the most important production system. The majority of these systems are found in dairy farms.

Regions: Map 5 shows the spatial distribution of the systems. Main areas are the lowlands of Lower Saxony,

Northrhine-Westphalia and Thuringia, as well as the river landscapes of Brandenburg, and, like in Saxony-Anhalt, the fens. The systems are also found in the rolling hills and highlands of Schleswig-Holstein, Baden-Wuerttemberg, Hesse, Rhineland-Palatinate, Saxony-Anhalt and Saxony.

Animals: Breeds used are typically Holstein and are usually recruited from the own dairy herd on the same farm. Exceptions are Northrhine-Westphalia and Saxony, where purchase of crosses by specialised finishers is common. Further, German Red Holstein calves are used in the South West and in Schleswig-Holstein, typically on a purchase basis to fill existing barn space on dairy farms.

Performance: There is wide variation in this group. The final age of these animals is between 595 and 700 days, corresponding to a finishing period of 525 - 625 days. Start weights are between 55 and 70 kg live weight (LW) and final weights vary between 590 and 690 kg LW. Accordingly, daily weight gains range between 840 and 1,170 g. Dressing percentages vary from breed to breed and size of animal and are between 52 and 60 percent.



Note: Highlighted regions indicate the existence of certain production systems, **not** the density

Map 5:

Spatial distribution of bull finishing from calves and starters (Brömmer, 2005)

² More indicators as well as information on the spatial distribution of the production systems are found in the full (German) version of Brömmer (2005), available on the **agri benchmark** website.

Feed: Grass silage and corn silage (wherever possible to grow) are the main forages, complemented by home-grown grains, purchased concentrates (pellets) and soybean meal. Depending on the local proximity to food processing plants, brewers grain, distillers grain, pressed exhausted beet slices and potato pulp are found in the rations.

Other: Animals are typically kept in groups on slatted floors in cubicle sheds. In some old buildings animals are kept on straw. Group sizes vary from 5 to 10 animals.

4.2 Bulls from (dairy) starters

The production system 'Bulls from starters' is found in six of the federal states. The main difference to 'Bulls from calves' are a) the higher age and weight at start (40 - 80 days, 80 - 105 kg LW) and b) the predominant use of Fleckvieh calves. Bulls from starters are the predominant form of finishing with specialised finishers. Apart from better performance of Fleckvieh, another main reason is the availability of relatively large groups of starters from auctions or marketing organisations from South Germany. This way, transaction and management costs are reduced, and few larger groups show fewer health problems than many small groups.

Regions: Map 5 shows that this system is mainly located in a West-East band through Baden-Wuerttemberg and Bavaria and in the North of Northrhine-Westphalia. Other areas where this system is found are parts of Lower Saxony, Mecklenburg-Vorpommern and Thuringia. Main natural locations are low land plains with exceptions found in rolling hills in Bavaria, Thuringia as well as highlands in Baden-Wuerttemberg.

Animals: The main breed is Fleckvieh and its crosses. In the Northern States all animals are purchased from the South. In Baden-Wuerttemberg, an estimated 30 percent of the bulls are finished in the State whereas in Bavaria this percentage is 60 percent. Further breeds are Brown Cattle in Lower Saxony and Holstein in Northrhine-Westphalia.

Performance: The age and weight at start varies from 40 - 80 days and 80 - 105 kg. Final age and weights are between 525 and 590 days and 675 - 700 kg LW. Resulting daily weight gains vary from 1,040 - 1,380 g. The dressing percentages are relatively high with an average of 58.5 percent, ranging from 57 - 62 percent.

Feed: The feed base is corn silage and grass silage with a clear dominance of corn silage plus concentrate pellets and/or soybean meal, the latter of which are bought in. Additional feedstuffs are identical to the ones listed in Chapter 4.1.

Other: These systems are mainly combined with a cash crop enterprise where grains are either sold or fed to the

bulls. Dairy is another enterprise typically combined with the bull finishing in Southern Germany. Combination with pigs is common in Lower Saxony and Northrhine-Westphalia. Animals are typically kept in cubicle sheds with slatted floors. Group sizes are typically six (adult) animals but can go up to 25.

4.3 Bulls from stores/backgrounders

The main characteristics of this system are that the animals have undergone a pre-finishing phase before they are bought. Animals are typically between 135 - 155 days old. The finishing farms can buy the animals as ruminants and do not need to feed the calves with milk supplements anymore, saving labour. Consequently, this type of bull finishing is the least labour-intensive.

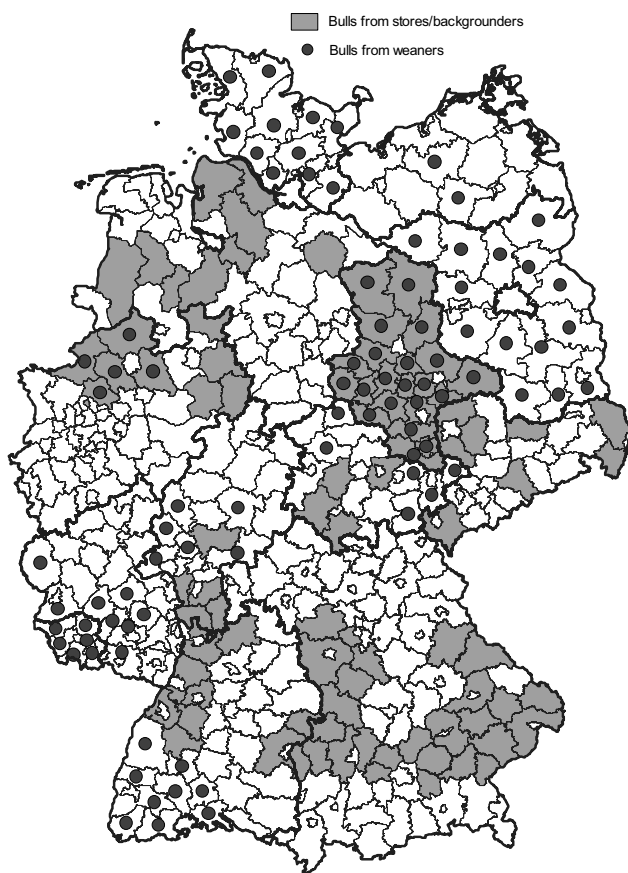
Regions: This system is operated to a greater extent in eight out of the 13 regions analysed. Map 6 indicates that main regions representing this system are West and East Bavaria (coinciding with regions finishing bulls from starters) and East Baden-Wuerttemberg (Alb), West Baden-Wuerttemberg (coinciding with bulls from calves), North of Northrhine-Westphalia and the West and Centre of Lower Saxony. Further, in Saxony-Anhalt, the system is rather common and it is found in isolated cases in some parts of Thuringia, Hesse and Saxony.

Animals: The main breed used here is again Fleckvieh. In Saxony-Anhalt an estimated 50 percent of Holstein are used, some of which come from Poland and Romania. In Baden-Wuerttemberg and Lower Saxony, Charolais and Limousin stores are finished, mostly coming from France. The vast majority of the Fleckvieh stores originate from South Germany.

Performance: The relatively high ages at start correspond with weights of between 190 - 200 kg LW. With a final age between 595 - 670 days, the finishing period is only 440 - 540 days. Final weights are between 615 and 695 LW with a dressing percentage of 57.5 percent (56 - 59), resulting in carcass weights of 365 - 410 kg. Daily weight gains are between 1,050 and almost 1,400 g.

Feed: Like in the other production systems, corn and grass silage are the main forages. It seems, however, that the extent of their use varies significantly between the regions. Farms in Bavaria, Northrhine-Westphalia and Saxony hardly use any grass silage at all whereas in the other regions, grass silage has a much higher share in the ration. In some farms in Lower Saxony and Northrhine-Westphalia, 10 - 15 percent of the forage is bought in if they are located in arable regions. The concentrate, grain and supplementary ingredients are similar to the ones explained in the previous chapters.

Other: A cash crop enterprise is typically found in the farms finishing store cattle. The combination with dairy



Note: Highlighted regions indicate the existence of certain production systems, **not** the density

Map 6:

Spatial distribution of bull finishing from weaners and store cattle (Brömmer, 2005)

is frequently found in Bavaria, Lower Saxony and Saxony-Anhalt. The animals are kept in groups of 6 - 10 animals in cubicle sheds with slatted floors. In some cases in Bavaria animals are kept on straw. Group sizes can reach 70 animals if on straw.

4.4 Bulls from (suckler-cow) weaners

Contrary to the other systems analysed so far, the animals for this system originate from the suckler-cow herd.

Regions: Map 6 illustrates the spatial distribution of the production system. A certain overlapping with the spatial distribution of suckler-cows shown in Map 2 can be observed in the very Southwest of Germany, Mecklenburg, Brandenburg, Rhineland-Palatinate, the Saarland as well as Schleswig-Holstein, all regions where both grassland and arable land are found in adjacent locations. It also seems to have a certain importance in the finishing regions of Northern Northrhine-Westphalia and in the state of Saxony-Anhalt. Consequently, except Northrhine-Westphalia,

farms would often finish their own weaners produced from their suckler-cow herd with additional purchase of weaners from other farms of up to 50 percent.

Animals: The animals mainly come from beef breeds. Most common are Charolais, Limousin, Fleckvieh and their crosses. Fleckvieh is often used as the dam and the French breeds mentioned (plus Belgian Blue and Blonde d'Aquitaine) are used as sires to produce a crossbred terminal product.

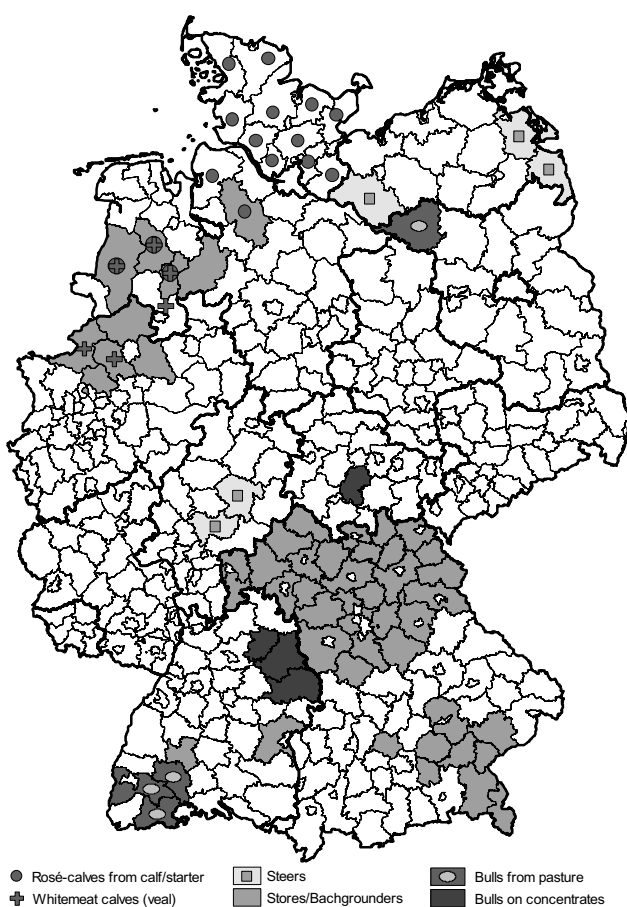
Performance: The finishing period of weaners starts at the day of weaning when they leave the suckler-cow herd. The ages at weaning (and start of finishing) vary significantly but the majority of the weaners are between 220 and 290 days old. Depending on the age at weaning, the breed and the nutritional status, calves weigh between 245 and 350 kg at the start of finishing. Ages at the end of finishing are between 530 and 665 days and the final weights vary between 615 and 695 kg LW. Daily weight gains tend to be on a higher level as a result of the genetic potential. With dressing percentages between 57 and 64 percent (due to the use of beef breeds) carcass weights are slightly higher than in the other systems analysed) and vary between 350 and 420 kg.

Feed: Similar to the other production systems, main forages are grass silage and corn silage, the latter almost exclusively in Schleswig-Holstein, Mecklenburg and Thuringia, supplemented by up to 35 percent of concentrates, soybean meal and grains in the ration. In the other regions, a mixture between grass silage and corn silage is fed with lower levels of supplementary feed. Similar to the other systems and depending on the proximity to food processing plants, food and feed production residuals are fed.

Other: Similar to the other systems, animals are kept in groups of around 6 animals in cubicle barns with slatted floors. Barns with straw base can hold groups of up to 60 animals. In some farms in Thuringia, heifers are finished in addition to the male animals.

4.5 Steers

Steer production is of minor importance in Germany and has a share of just one percent in total beef production (ZMP, 2007). Steers' daily weight gains are between 10 and 15 percent less than those of bulls. Further, feed conversion is about 10 percent lower than bulls. This results in longer finishing periods to achieve a given weight and a lower classification of the carcass than bulls. Finally, steers tend to put fat on more easily when grown beyond a certain weight than bulls, and the German processing industry prefers large carcasses of up to 430 kg. Consequently, despite the better marbling and tenderness, steers only receive lower per kg prices than bulls (ZMP, 2007). Thus, without a special marketing activity like direct marketing,



Note: Highlighted regions indicate the existence of certain production systems, **not** the density

Map 7:

Spatial distribution of other finishing systems (Brömmer, 2005)

steer production is not profitable (Wiedenmann, 1999). This statement holds especially true after the decoupling of the payments (see also conclusions in Chapter 5).

Regions: Mecklenburg and Hesse were the two regions where steer production still has a certain significance (Map7). Especially in Mecklenburg, animals are produced as organic, mainly coming from the own suckler-cow herd. Main locations are lowland areas with light soils (Mecklenburg) and highlands (Hesse).

Animals: Most of the animals are Fleckvieh crosses. In Mecklenburg, about 90 percent of the steers are weaners from cow-calf and 10 percent from dairy (Holstein). In Hesse, animals are typically from the cow herd and are composed of the breeds Fleckvieh, German Red Holstein and Holstein.

Performance: Animals entering the finishing as weaners are typically between 260 and 280 days of age and 290 and 300 kg LW. The final age is at 680 - 700 days, reaching a final weight of 590 - 600 kg.

Other: Animals in Mecklenburg are mostly kept outside all year round. Similar to Hesse, this principle may be changed during the winter (if the location is too wet to allow outside keeping) or for the final finishing period.

Feed: Pasture is the exclusive forage source in this system in summer. Animals which are kept outside during winter time receive 1 - 2 kg per day supplement feed in terms of grains or concentrates. In case of indoor keeping the animals receive grass silage and hay plus grains or concentrates, if necessary.

4.6 Stores/backgrounders

Store/backgrounder cattle were included in this list despite the fact that they do not produce the final product (meat) but because they are part of the fattening/finishing process. They are often produced in farms with limited land (and forage) availability for beef finishing. Farmers producing store cattle need a sound knowledge of raising calves and barns must be well suited to the calves' needs. The stores produced by these farms are typically sold to finishers who do not want to get involved in raising calves for lack of labour, knowledge or suitable buildings. When sold, stores should have the following characteristics: they should be completely weaned from milk, should be used to take in silage in the required amounts, dehorned, vaccinated and healthy. Groups of store cattle for sale should show a high degree of conformity (Wiedenmann, 1999).

Regions: Store production takes place only in four regions to a significant extent. These are mainly the North and the South of Bavaria, the North of Northrhine-Westphalia and in parts of Lower-Saxony. They are mainly located in arable regions (see Map 7).

Animals: Store production mainly takes place with Fleckvieh-starters and to a lesser extent with Brown Cattle. In Lower-Saxony most of the animals come from Baden-Wuerttemberg (among them some Brown Cattle) whereas in Northrhine-Westphalia the majority are Fleckvieh from Bavaria.

Performance: Starters are about 35 days old and weigh about 80 kg when store production starts. Final ages are between 120 - 150 days and the transfer weight to the finishers is about 190 - 200 kg LW. Daily weight gains are between 1000 and 1,200 g. The objective is to have 3 production cycles per year.

Feed: Given the low age of the animals, they receive milk substitute and special calf starter feed for more than 50 percent of their time. After this period, they are fed with corn silage and varying amounts and composition of concentrates and soybean meal as well as straw and hay in low quantities.

Other: Cash crop production is typically combined with store cattle production. In Baden-Wuerttemberg and

Northrhine-Westphalia pig production is often found in combination with the stores. Milk production only appears a common combination in Northrhine-Westphalia, as many farms in Baden-Wuerttemberg, Lower-Saxony and Bavaria have specialised in store cattle production. Between 10 - 30 percent of store producers are also bull finishers. Depending on price relations, these farms can sell their animals as stores or finish them as bulls. Further, they can finish those stores which do not meet the market requirements themselves to maintain high price levels throughout the entire groups sold. Stores are kept on straw at the beginning and later on slatted floors in groups of 7 to 70 animals.

4.7 Rosé calves from calves/starters

The origin of this type of finishing is Schleswig-Holstein. Animals are almost exclusively sold to the Netherlands where this type of meat is in high demand. Apart from the market that had to be there, the incentive for German producers was the possibility to receive the special premium for male cattle under the old Agenda 2000 policy regime for animals of 9 months and older irrespective of their weight. With approximately 1.3 cycles per year, producers could thus maximise their subsidy income producing Rosé calves. It is estimated that in Schleswig-Holstein a share of 10 percent of all male Holstein cattle are turned into Rosé-calves and in Lower Saxony about five percent.

Regions: Main regions are Schleswig-Holstein and Lower Saxony, producing 16,000 and 21,000 Rosé calves in 2004. A further 15,000 calves are produced in East Germany but are not specified here due to the lack of information (see Map 7).

Animals: Mainly Holstein calves are used to produce Rosé meat, in Schleswig-Holstein also Angeln. These milk breeds are significantly cheaper than dual purpose or beef breeds. Further, they achieve higher daily weight gains in the first months than the other breeds mentioned. The share of calves and starters at the beginning of the finishing is 50/50. Due to the bigger farm sizes in Lower-Saxony, they tend to buy a higher share of animals (about 80 percent) than in Schleswig-Holstein (only 20 percent) where most of the animals come from the own dairy herd.

Performance: Animals entering the system are calves or starters. The final age is 280 - 290 days and weights are 390 - 410 kg LW. With dressing percentages of just 52.5 percent, this provides the required carcass weights of 190 - 210 kg. Daily weight gains are relatively high between 1,270 and 1,390 g.

Feed: Feeding has to be special to achieve the pink meat colour. This is achieved by not feeding feed high in crude fibre. The rearing ration consists of milk substitutes and starter feed for calves. The finishing ration of

the Rosé calves consists of equal parts of corn silage and concentrate pellets (in dry matter). In some farms hay and chopped straw is provided for better rumen-forming and feed intake. Depending on the price relations, farms also feed potatoes, brewer's grain and pressed exhausted beet slices.

Other: Combination with cash crops and dairy is most common, the latter mainly in Schleswig-Holstein. Many farms also combine Rosé calves with bull finishing for the option to switch between both systems depending on the market. In the rearing phase animals are kept on straw, later on slatted floors. About 70 percent of the animals are sold live to the Netherlands and are slaughtered there, the remainder is killed locally and the meat transported to the Netherlands.

4.8 Calf production (white veal)

The white veal calf production (further referred to as veal production) is characterised by the highest degree of vertical integration of the German beef and veal supply chain. About 70 percent of the producers are integrated under three companies. The veal production goes back to the years 1953/54 when milk powder was abundant and converted into milk substitute, depressing soybean prices as a substitute. As a reaction, the soybean and grain traders affected started to produce veal with the milk substitute. They hired barns and made contractual - custom feeding - agreements with the veal producers, providing the animals and the feed. Veal production is a labour and capital intensive, highly specialised, high risk (diseases) and low margin business (Krämer, 2005).

There are 420,000 calves annually produced in Germany, out of which 85 percent are slaughtered in Lower Saxony and Northrhine-Westphalia. The rest of the animals are slaughtered in the Netherlands. The calf production of other main EU-producers is: Netherlands: 1.2 million; France: 1.6 million; Italy: 1 million.

In Germany, there are presently 200 calf producing farms with sizes varying from a few hundred up to 6,000 calves one-time-capacity.

Regions: Lower Saxony (Weser-Ems district) and two counties in the North of Northrhine-Westphalia are the main locations for calf production (see Map 7).

Animals: Exclusively Holstein cattle, which possess a better growth- and gain potential in the first months of their lives, are used for veal production. Calves are typically bought into the specialised farms from all around Germany.

Performance: Due to the high degree of integration, the performances are very similar between the farms. With start values of 14 days and 45 kg LW, animals are finished after 170 days and 245 - 250 kg, corresponding to daily

weight gains of 1,260 g. A dressing percentage of 57 percent provides a carcass weight of 140 kg.

Feed: To achieve the consumer-preferred white colour of the animals, a low-iron diet is required. This is realised by feeding milk substitute representing 90 percent of the dry matter. To comply with animal welfare legislation, at least 10 percent and 100 g per day of the feed must be rich in fibre, a requirement that is typically met by feeding corn silage which is often purchased.

Other: Farms are usually specialised, sometimes landless operations buying most to all of their feed. Typical enterprise combinations are cash crops. Calves are usually kept in individual animal boxes for the first 8 weeks and after that in groups of 6 animals on slatted floors.

4.9 Young bulls from pasture - a special case

This specific and organic system tries to meet the specific consumer demand for animal and environmentally friendly beef production. It is a combined suckler-cow and young bull production with animals being less than 12 months old at slaughter. Animals that are heavy enough are slaughtered directly after weaning.

Regions: The Southwest of Baden-Wuerttemberg and the Northwest of Brandenburg are the two main regions for this system (see Map 7).

Animals: Animals are typically Charolais, Limousin and Fleckvieh. In Brandenburg, Salers are found as well, and in Baden-Wuerttemberg, Hinterwälder. The nature of the system is such that animals come exclusively from the own suckler-cow herd and no animals are purchased from outside.

Performance: As regards the performance data, the system is comparable with the Rosé calf production. However, it should be said that the low figures for age (14 days) and weight (45 kg) at start of finishing might be confusing as the calves are with the suckler-cows until weaning at around 8 months of age. Animals weigh 385 - 405 kg LW at slaughter. With dressing percentages of 55 - 57 percent, carcass weights are around 200 - 242 kg. These weights are usually achieved by grass-grain finishing the animals after weaning and an age at slaughter of 300 - 335 days.

Feed: In Brandenburg animals are kept outside all year round. 20 percent of the ration is organic concentrates or grains. In Baden-Wuerttemberg, animals are typically kept in barns during the winter period from October/November to April. Feed in this period consists of grass silage, hay and 20 percent organic grains.

Other: The marketing of the animals in Brandenburg is done via a marketing association and an own brand. The same applies to about 50 percent of the cattle produced in Baden-Wuerttemberg whereas the other 50 percent are sold directly to the final consumers.

4.10 Bulls from concentrate finishing - a special case

Concentrate finishing is defined as a production system where more than 50 percent of the feed comes from concentrates. This means that the Rosé calf production described in Chapter 4.7 can be considered as concentrate finishing. The bull finishing from concentrates is a special case in Germany. Spain is the only country in the EU where this system is of significant importance.

Regions: The system is only relevant in Thuringia and the Northeast of Baden-Wuerttemberg (see Map 7).

Animals: Animals in Thuringia are typically Fleckvieh stores from Baden-Wuerttemberg and Bavaria. In Baden-Wuerttemberg, Fleckvieh starter as well as stores are used. This explains the wide variation in the start age and weight figures shown in Table 5.

Performance: Animals are bought with 40 - 70 days (starter) and 180 - 210 days (stores) and are finished after 500 days (starter) and 360 days (stores). Daily weight gains are around 1,300 g, resulting in final weights of 695 - 710 kg, transforming into carcass weights of 400 - 420 kg at a dressing percentage of around 60 percent.

Feed: The feed composition provides the name for this production system where 80 percent of the rations consist of concentrates (Thuringia) and 75 percent consist of grains in Baden-Wuerttemberg. In both regions straw is used to provide the necessary fibre at low cost. Concentrates and straw are usually mixed with molasses into a total mixed ration.

Other: The non-use of forages like grass and corn silage usually leads to a combination with a cash crop enterprise that provides the straw for feeding and bedding if the system is straw-based. Very often the animals are kept in cubicle sheds on slatted floors.

5 Conclusions

The paper is a first step in creating a systematic overview on beef production systems in Germany. Given the limited time and financial resources of the project, it does not claim to be, nor is it representative or complete. It should, however, provide a good idea about the prevailing beef production systems in Germany.

Improvements could be made on the information of the spatial distribution, for example, by introducing quantified thresholds from where onwards a system in a region is of relevance. Further, the different production systems could be further specified and detailed in terms of feeding, handling and housing the animals.

The systems were analysed before the decoupling of the payments was implemented in 2005. After this change, it can be expected that steer production will be reduced further as it has lost approximately € 500 per head in direct

payments compared with € 200 - 300 for bulls. Further, pressure on bull production in areas with a high importance of corn production has increased due to the financial support to biogas production using corn silage, too.

In conclusion, the present changes in framework conditions (policy, prices, bio-energy) make an update in due time reasonable.

Acknowledgement

The authors would like to thank the experts from extension services, regional administrations and research institutions all around Germany who generously contributed their knowledge and expertise to this paper. Their contributions allowed us to create an almost complete regional coverage of production systems of beef finishing in Germany. A full list of collaborators as well as the full German version of the thesis forming the basis of this paper (Brömmer, 2005) can be downloaded from the **agri benchmark** website at http://www.agribenchmark.org/beef_results_project_list.html.

References

- Bogner H (1978) Rindfleischproduktion. Stuttgart : Ulmer, 485 p
- Brömmer J (2005) Produktionssysteme, räumliche Verteilung und Struktur der Rindermast in Deutschland – eine expertengestützte Analyse. Osnabrück : Univ, [Diplomarbeit]. Zu finden in < http://www.agribenchmark.org/beef_results_project_list.html>
- Deblitz C, Zimmer Y (2005) A standard operating procedure to define typical farms [online]. Zu finden in <http://www.agribenchmark.org/methods_typical_farms.html> [zitiert am 01.04.08]
- Geissler B, Günzler D, Hammer K, Hampel G, Rosenberger E, Spann B (1984) Mutterkuhhaltung. München : Landw. Bildberatung
- Matzke P, Graser U, Putz M, Röhrmoser G, Schlichting M, Spann B, Stark G, Stockinger C (1995) Wirtschaftliche Milchviehhaltung und Rindermast. Frankfurt a M : DLG-Verl, 363 p
- Pflaum J, Hollwich W, Röhrmoser G, Spann B, Süß M (1992) Rindermast. Stuttgart : Ulmer, 122 p
- Statistisches Bundesamt (Jahrgänge 1990-2003) Land- und Forstwirtschaft, Fischerei; Fachserie 3, Reihe 4: Viehbestand und tierische Erzeugung 1990 – 2003. Stuttgart : Metzler-Poeschel
- Statistisches Bundesamt (2003) Sonderauswertung Landwirtschaftszählung 2003. Bonn: BMVEL
- Wiedenmann F, Spann B, Fleischmann A, Wittkowski G, Averdunk G, Stockinger C (1999) Die Landwirtschaft – Tierische Erzeugung. München : BLV Verlagsges
- ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle (2007) ZMP-Marktbilanz : Vieh und Fleisch

Weiterentwicklung der Berechnung regionaler Stickstoffbilanzen am Beispiel Niedersachsen

Bernhard Osterburg¹ und Thomas Schmidt¹

Zusammenfassung

Dieser Artikel dokumentiert methodische Verbesserungen der regionalen Stickstoffbilanzierung mit Hilfe von Betriebsdaten und regional stark disaggregierten Daten der Agrarstatistik. Im Mittelpunkt stehen Schätzverfahren für die Bilanzglieder Raufuttererzeugung, Kraftfuttereinsatz und Mineraldüngerverteilung sowie der überbetriebliche Wirtschaftsdüngereinsatz. Darüber hinaus werden weitere potenzielle N-Belastungen aufgrund der Mineralisation von Moorböden, Landnutzungswandel und atmosphärischer Deposition thematisiert. Als Ergebnis steht eine top-down-Methode zur Stickstoffbilanzierung zur Verfügung, die auf den umfangreichen Datensatz der Agrarstrukturerhebung aufbaut. Aus datenschutzrechtlichen Gründen erfolgt die Berechnung auf Gemeindeebene. Die exemplarische N-Bilanzierung für das Bundesland Niedersachsen (Bezugsjahre 1999 und 2003) liefert eine Abschätzung der stofflichen Belastungspotenziale durch N-Überschüsse an der Bodenoberfläche und leistet damit einen Beitrag zum Emissionsmonitoring im Rahmen der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL).

Schlüsselwörter: *Stickstoffbilanz, Emissionsmonitoring, Wasserrahmenrichtlinie*

Abstract

Improved methods for calculating regional nitrogen balances using Lower Saxony as an example

This paper presents improved methods for calculating regional nitrogen balances based on farm accounting data and agricultural survey data at regional level. The focus is on estimates of the balance elements roughage, concentrated feeding stuffs, mineral fertiliser application and manure export. Further, potential N emissions from melioration of fens, land use change and atmospheric deposition are discussed. The result is a top-down-method for nitrogen balances based on detailed data sets of the farm structure survey. Due to data confidentiality calculations are performed at the level of municipalities. The exemplary calculation for the German federal state Lower Saxony (reference years 1999 and 2003) provides an assessment of potential pressures due to N surplus at soil surface as a contribution to an emission monitoring as part of implementation of the Water Framework Directive.

Keywords: *Nitrogen balance, emission monitoring, Water Framework Directive*

¹ Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei (vTI), Institut für Ländliche Räume, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig/Deutschland; Email: bernhard.osterburg@vti.bund.de

1 Problemstellung und Zielsetzung

Für die Erreichung der Ziele der EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) stellen diffuse Stickstoffemissionen aus der Landwirtschaft eine besondere Herausforderung dar. Um eine ausreichende Entscheidungsgrundlage für die Maßnahmenplanung gemäß Artikel 11 der EU-WRRL und für die Aufstellung von Bewirtschaftungsplänen entsprechend Artikel 13 bereitzustellen, sind über die bisherigen Bestandsaufnahmen hinausgehende qualifizierte stoffliche Zustandsbeschreibungen zu entwickeln (NLWKN und NLfB, 2005). Vor diesem Hintergrund wurde das vom Niedersächsischen Umweltministerium finanzierte Projekt „Integriertes Monitoring des chemischen Zustandes des Grundwassers“ („Monitoring-Projekt“) durchgeführt, an dem die Autoren mit der Berechnung regionaler Stickstoffbilanzen beteiligt waren (Schmidt et al., 2007).

Ziel dieses Artikels ist es, die im genannten Projekt erarbeiteten, methodischen Weiterentwicklungen für eine verbesserte Berechnung regionaler Stickstoffbilanzen vorzustellen. Die vorgestellten Methoden beziehen sich auf Bilanzelemente, bei denen besonders hohe Unsicherheiten bestehen, namentlich die Nährstoffabfuhr über Raufutter (Grünland und Feldfutterbau), die regional eingesetzten N-Mineraldüngermengen sowie Export und Import von Wirtschaftsdünger. Ergänzend wurden meliorierte Moorböden, Grünlandumbruch und atmosphärische Deposition als weitere Ursachen diffuser N-Emissionen untersucht und in Relation zu den N-Bilanzüberschüssen gesetzt, die aus dem jährlichen Düngungs- und Ertragsgeschehen in der Landwirtschaft resultieren. Die Berechnung belastbarer regionaler Bilanzen liefert eine Grundlage für die Problemanalyse, die Aufdeckung von Schwachstellen und die Abschätzung von Anpassungsspielräumen zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie.

2 Methoden und Datengrundlagen für die Bilanzberechnung

Da für Hoftorbilanzen auf regionaler Ebene die Datengrundlage fehlt, kam als Methode für die regionale Bilanzrechnung nur die Flächenbilanz in Betracht. Die Flächenbilanzberechnungen erfolgten auf Gemeindeebene und basieren auf Daten der Agrarstatistik. Methodisch wurde auf dem Ansatz für die Berechnung regionaler Flächenbilanzen von Bach et al. (2003) aufgebaut, bezüglich Annahmen und Unsicherheiten der verschiedenen Bilanzmethoden sei zudem auf Bach und Frede (2005) verwiesen. Im Mittelpunkt der methodischen Weiterentwicklung standen die Schätzung der N-Abfuhr über Raufuttererträge und der regionalen Zufuhr über N-Mineraldünger, die in Abschnitt 3 näher dargestellt werden.

2.1 „Top-down“- und „bottom-up“-Ansatz

Die Verbesserung der N-Bilanzberechnung sollte auf Grundlage flächendeckend verfügbarer und fortschreibungsfähiger statistischer Daten erfolgen. Da dieser Ansatz ohne zusätzliche, auf regionaler Ebene vorliegende Informationen durchgeführt wurde, wird er als „top-down“-Ansatz bezeichnet. Das Monitoringkonzept wurde innerhalb von drei Testgebieten in Zusammenarbeit mit Arbeitskreisen diskutiert und überprüft, in denen neben der Wasserwirtschaft auch Berater und Landwirte vertreten waren. Zur Validierung der Bilanzergebnisse wurden lokale Betriebsdaten verwendet. Die Testgebiete lagen in den niedersächsischen Flusseinzugsgebieten von Ilmenau und Jeetzel (Flächen überwiegend in den Landkreisen Lüneburg, Uelzen und Lüchow-Dannenberg), Große Aue (Diepholz und Nienburg) sowie Lager Hase (Cloppenburg und Vechta). Das Heranziehen regionalen Expertenwissens sowie lokaler Informationen zu Nährstoffbilanzen, beispielsweise Nährstoffaufzeichnungen nach Düngeverordnung oder Hoftorbilanzen aus der Wasserschutzberatung, wurde im Projekt als „bottom-up“-Ansatz bezeichnet. Eine flächendeckende Umsetzung des „bottom-up“-Ansatzes wäre sehr aufwändig und aufgrund unterschiedlicher Datenverfügbarkeit problematisch bezüglich Repräsentativität und Aussagekraft. Daher standen beim Vergleich beider Ansätze die Überprüfung der Ergebnisse der flächendeckenden N-Bilanzrechnungen und die Verbesserung der zugrunde liegenden Kalkulationsmethode im Vordergrund.

2.2 Datengrundlagen

Wichtigste Datengrundlage bildete eine tabellarische Auswertung der Agrarstrukturerhebungen der Jahre 1999 und 2003 für die landwirtschaftlichen Anbauflächen und Viehbestände auf Gemeindeebene, die durch das Niedersächsische Landesamt für Statistik bereitgestellt wurde. Ergänzend wurden Daten zur Ernteerhebung und Milchleistung der Milchkühe herangezogen, die auf Kreisebene vorliegen und auf alle Gemeinden eines Kreises angewendet wurden. Weitere Angaben lagen lediglich auf Landesebene vor, z. B. grenzüberschreitende Wirtschaftsdüngerimporte sowie Klärschlamm- und Komposteinsatz in der Landwirtschaft. Diese Kategorien wurden pauschal als durchschnittliche Zufuhr auf jeden Hektar Ackerland in Niedersachsen bezogen. Als Konsistenzrahmen für den Einsatz von N-Mineraldünger wurden die statistisch erfassten Absatzzahlen zur Düngemittelversorgung in Niedersachsen herangezogen. Dabei wurde die Annahme getroffen, dass die Absatzmenge der in der niedersächsischen Landwirtschaft eingesetzten Mineraldüngermenge entspricht und kein wesentlicher Austausch mit anderen

Tabelle 1:

Informationsquellen zur Berechnung der N-Bilanz

Mengengerüst	Aggregationsebene	Einheit	Quelle
Bodennutzung und Anbauflächen nach Fruchtarten	Gemeinde	ha	Bodennutzung und Ernte (NLS, 2003a)
Ertragsdaten der Marktfrüchte, Milchleistung	Kreis	t/ha kg/Kuh	Besondere Erntermittlung (NLS, 2004) Milchleistung (NLS, 2003b),
N-Abfuhr über Raufutter (Grünland, Feldfutter)	Betrieb	kg N	Raufutter-Abfuhr wird anhand des Viehbestands und der Milchleistung geschätzt (s. Abschnitt 3.1)
Viehbestand	Gemeinde	Stück	Stat. Landesämter, Reihe C III (Tierische Erzeugung)
Export und Import von Wirtschaftsdünger	Gemeinde	ja/nein	Niedersächsisches Landesamt für Statistik, Angaben zu Abgabe und Aufnahme von Wirtschaftsdünger
Klärschlamm	Bundesland	t	Nds. Umweltministerium, Klärschlammbericht
Kompost	Bundesland	t	BGK, 2005
Grenzüberschreitende Abfallverbringung	Bundesland	t	UBA, Fachgebiet III 3.1, Übergreifende Angelegenheiten der Abfallentsorgung
Mineraldüngerversorgung	Bundesland	t	Stat. Bundesamt, Fachserie 4, Reihe 8.2 (Düngemittelversorgung)
Mineraldüngereinsatz	Betrieb	t	Betriebsdatenauswertung aufbauend auf Osterburg et al., 2004 und weiterführende Analysen (s. Abschnitt 3.2)
Nährstoffgehalte der Marktfrüchte	Kulturart	kg/dt	Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Musterverwaltungsvorschrift zur Düngeverordnung (BML, 1996)
Legume N-Bindung	Kulturarten des Ackerbaus, Grünland	kg/ha	Musterverwaltungsvorschrift zur Düngeverordnung (BML, 1996)
Ammoniakverluste aus legumer N-Bindung	legume N-Bindung	% der N-Bindung	Annahme nach EEA, 2004
Nährstoffausscheidungen der Tiere	Tierkategorie	kg N/a * Stallplatz	Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Musterverwaltungsvorschrift zur Düngeverordnung (BML, 1996)
Ammoniakverluste aus Wirtschaftsdünger	Rinder, Schweine, Geflügel, Pferde u. Schafe/Stall, Lager, Ausbringung, Weide	% der N-Ausscheidung	Annahmen nach Döhler et al. (2002)

Quelle: Eigene Darstellung.

Regionen außerhalb von Niedersachsen besteht bzw. sich die Aus- und Einfuhren quantitativ entsprechen. Diese Einschätzung ist aufgrund der Flächengröße Niedersachsens relativ sicher. Für kleinere Bundesländer wäre der Unsicherheitsbereich wesentlich größer.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Datenquellen. Für die Koeffizienten der Nährstoffgehalte in pflanzlichen Ernteprodukten und für die Bestimmung der tierischen N-Ausscheidungen wurden Werte der Musterverwaltungsvorschrift zur Umsetzung der Düngeverordnung von 1996 (BML, 1996) sowie aktualisierte Koeffizienten der Landwirtschaftskammer Niedersachsen aus dem Jahr 2005 zugrunde gelegt.

Die folgenden Bilanzglieder wurden bei der Kalkulation der Flächenbilanz (N-Überschuss bzw. N-Saldo) berücksichtigt:

N-Bilanzüberschuss = tierische N-Ausscheidungen abzügl. Ammoniakverluste
 + Mineraldünger
 + Sekundärrohstoffdünger (Klärschlamm, Kompost)
 + legume N-Bindung abzügl. Ammoniakverluste

+/- Im- und Export von Gülle und Festmist (bei Import abzügl. Ammoniakverluste bei der Ausbringung)
 - Abfuhr von Marktfruchtprodukten und Raufutter

Die Bilanzwerte wurden auf die produktiv genutzte landwirtschaftliche Nutzfläche (LF) bezogen, also ohne Berücksichtigung der Flächenstilllegung (Brache und sonstige stillgelegte Flächen ohne Anbau nachwachsender Rohstoffe). Bei den Bilanzelementen, die nicht berücksichtigt wurden, handelt es sich um die Nährstoffzufuhr über das Saatgut, asymbiontische N-Bindung, atmosphärische N-Deposition und N-Verluste durch Denitrifikation. Die Berücksichtigung von Saatgut würde etwa 1 kg N/ha LF ausmachen. Für die asymbiontische N-Bindung liegen keine abgestimmten Koeffizienten vor, zudem dürfte sie nur zu einer geringen Erhöhung der N-Zufuhr beitragen. Atmosphärische N-Deposition und die Quellen- und Senkenfunktion des Bodens werden in Abschnitt 5 aufgegriffen. Im Gegensatz zu gasförmigen Ammoniakverlusten aus Wirtschaftsdüngern und legumer N-Bindung wurden Ammoniakverluste aus Mineraldünger nicht berücksichtigt. Diese können laut Nationalem Inventarreport ca. 4 - 5 % der N-Menge im Mineraldünger betragen (Dämmgen, 2007), was durchschnittlich

5 - 6 kg/ha LF ohne Flächenstilllegung entspricht. Eine vollständige Darstellung der Daten und Methoden ist in Schmidt et al. (2007) enthalten.

2.3 Unsicherheiten

In Tabelle 2 werden eine Reihe von Unsicherheiten benannt, die deutlich machen, dass es sich bei den Bilanzrechnungen um Schätzungen handelt. Zu unterscheiden sind fünf Kategorien von Unsicherheiten:

- Korrekte Erfassung des Mengengerüsts: Hierunter fallen das Problem der Erhebungsgrenzen der Agrarstatistik und die Frage, ob relevante Aktivitäten außerhalb der erfassten landwirtschaftlichen Betriebe stattfinden. Die nach Flächenerhebung auf Basis von Katasterdaten erhobenen Flächenumfänge übertreffen i.d.R. die Angaben nach Agrarstrukturerhebung, in der nur Flächen in landwirtschaftlichen Betrieben erfasst werden.

- Dies kann u.a. auf unterschiedliche Abgrenzung nicht landwirtschaftlich genutzter Offenlandflächen, auf die Fläche von Landschaftselementen wie Hecken und auf statistisch nicht erfasste Kleinbetriebe zurückgeführt werden. Vor allem die Pferdebestände werden durch die Agrarstatistik nur lückenhaft erfasst, da gewerbliche Reitbetriebe und der Hobbybereich nicht vollständig erhoben werden. Bezüglich der pflanzlichen Erträge von Grünland und Feldfutterbau bestanden größere Unsicherheiten, dagegen zeigte ein Vergleich der Erträge aus der Agrarstatistik für Getreide, Ölsaaten, Kartoffeln, Zuckerrüben mit Erträgen aus Nährstoffaufzeichnungen gemäß Düngeverordnung im ehemaligen Kammergebiet Hannover eine gute Übereinstimmung.
- Vollständigkeit des Mengengerüsts: Für den Export und Import von Wirtschaftsdünger und über die Bedeutung von Leguminosen auf Stilllegungsflächen und Grünland liegen keine quantitativen Daten vor, ebenso wenig über die Abfuhr und Verwendung von Neben-

Tabelle 2:

Unsicherheiten bezüglich der Datengrundlagen und Bilanzglieder

Datengrundlagen/Bilanzglieder	Erläuterung
Erhebungsgrenze der Agrarstatistik	Nach dem Agrarstatistikgesetz werden nur landwirtschaftliche Betriebe mit mindestens 2 ha landwirtschaftlich genutzter Fläche (LF) bzw. einer Mindestzahl von Tieren (z. B. 8 Rinder) erhoben.
Differenz zwischen Flächen- und Agrarstrukturerhebung	Nach Flächenerhebung werden im Vergleich zur Agrarstrukturerhebung meist mehr landwirtschaftliche Flächen ausgewiesen, Differenz oft über 5 %.
Anzahl Pferde	Das Marktforschungsinstitut Ipsos hat für das Jahr 2001 in Niedersachsen und Bremen einen Bestand von 226.262 Pferden gezählt (FN, 2001), während die Agrarstatistik ca. 99.300 Pferde (in landwirtschaftlichen Betrieben) meldet.
Betriebssitzprinzip der Agrarstatistik	Flächen und Stallplätze in anderen Gemeinden werden der jeweiligen Gemeinde zugezählt, in der der bewirtschaftende Betrieb seinen Sitz hat. Dies kann zu Verzerrungen der regionalen Abbildung führen.
Tierische Ausscheidungen	Für alle Regionen und Betriebssysteme gleiche Koeffizienten, N-reduzierte Fütterung bleibt unberücksichtigt.
davon Ammoniak-Verluste aus Stall, Weide und Lagerung	Mittelwert aller Haltungssysteme.
davon Ammoniak-Ausbringungsverluste aus eigenem Wirtschaftsdünger	Mittelwert aller Ausbringtechniken.
Wirtschaftsdünger-Exporte und Importe	Exporte und Importe von Wirtschaftsdünger werden aus Potenzialen der liefernden und aufnehmenden Betriebe geschätzt. Welche Mengen tatsächlich transferiert werden, ist nicht bekannt.
Legume N-Bindung	Vor allem vom Leguminosenanteil im Grünland abhängig, verwendete Annahme mit 30 kg N-Bindung/ha Grünland ist problematisch, da der Weißkleeanteil in Abhängigkeit von Standort und Bewirtschaftungsintensität sehr variabel ist. Keine Daten zu Leguminosen auf Stilllegungsflächen, daher nicht berücksichtigt.
Klärschlamm, Kompost, grenzüberschreitende Abfallverbringung	Da keine regional differenzierten Informationen zum Verbleib des landwirtschaftlich verwerteten Klärschlammes vorliegen, werden die in der Statistik auf Landesebene ausgewiesenen Mengen auf alle potenziell zur Verfügung stehenden Ackerflächen gleich verteilt.
Mineraldünger	Zeitliche und vor allem räumliche Zuordnung problematisch. Aus Betriebsdaten abgeleiteter Schätzalgorithmus zur räumlichen Verteilung wird auf regionale Statistikdaten angewendet (s. Abschnitt 3.2).
davon Ammoniak-Verluste	Bleiben in der vorliegenden Studie unberücksichtigt.
Abfuhr Marktfrüchte	Ertragsstatistik liegt nur auf Landkreisebene vor, N-Gehalts-Parameter landesweit einheitlich.
Abfuhr durch Stroh	N-Abfuhr durch Stroh wird nicht berücksichtigt (Annahme: Einstreu Stroh kehrt mit dem Stallmist auf Flächen zurück; über Strohverkauf und Strohverbrennung liegen keine Daten vor).
Abfuhr Raufutter	Unsicherheit über Grünland- und Feldfutterbauerträge und N-Gehalte. Daher wird ein aus Betriebsdaten abgeleiteter Schätzalgorithmus auf regionale Statistikdaten angewendet (s. Abschnitt 3.1).
Abfuhr von Biomasse für Feststoffverbrennung und Gärsubstrate, Zufuhr von Gärresten	Bleiben in der vorliegenden Studie aufgrund fehlender Datengrundlagen unberücksichtigt, für Referenzjahre 1999 und 2003 wird von nur geringer Bedeutung ausgegangen.
Quelle: Eigene Darstellung.	

produkten wie Stroh oder über den Handel mit Raufutter, z. B. Heu.

- Korrekte räumliche Zuordnung von Daten: Nach Betriebsprinzip erhobene Daten lassen keine exakte regionale Zuordnung von Flächen und Tierbeständen zu. Daten zum Klärschlamm- und Komposteinsatz liegen nur auf Landesebene vor und können nur pauschal als durchschnittliche Zufuhr in die Regionalbilanzen einbezogen werden. Beim Mineraldüngerabsatz ist sowohl die Zuordnung des Absatzes zur Landwirtschaft in Niedersachsen als auch die regionale Verteilung der Mengen mit Unsicherheiten verbunden. Ertragsdaten von Marktfrüchten liegen auf Kreisebene vor. Die Übertragung der Kreiswerte auf die Gemeinden führt zu Abweichungen gegenüber der tatsächlichen N-Abfuhr.
- Korrekte zeitliche Zuordnung von Daten: Alle Daten mit Ausnahme des Mineraldüngerabsatzes sind eindeutig auf ein Kalender- oder Erntejahr bezogen. Beim Mineraldüngerabsatz dürften Bestandsveränderungen durch Lagerung nur eine geringe Rolle spielen, da die jährlichen Schwankungen der Absatzmenge zwischen 1999 und 2003 im Vergleich zum Durchschnitt dieser Jahre unter 4 % lagen.
- Korrekte N-Koeffizienten: Es wurden Mittelwerte ohne Differenzierung nach Qualitäten (Brot- oder Futterweizen) oder Fütterung in der Tierhaltung verwendet. Bei Milchkühen wird die tierische Ausscheidung in Abhängigkeit von der Milchleistung kalkuliert, weitere von der Tierleistung abhängige Berechnungen wurden nicht vorgenommen. Auch für die Prozentanteile gasförmiger NH_3 -Verluste kommen pauschalisierte Mittelwerte zur Anwendung.
- Zukünftig spielt die Bioenergieerzeugung eine immer größere Rolle, gleichzeitig liegen jedoch keine verlässlichen Daten über Verwendungsmengen vor, so dass die N-Abfuhr über Festbrennstoffe und Gärsubstrate sowie die Rückführung von Reststoffen (z.B. Gärrückstände) und deren N-Gehalte weitere Unsicherheitsquellen darstellen.

Die berechneten Bilanzen beschränken sich auf die in der Agrarstrukturerhebung erfassten Flächen und Tierbestände. Nach Bach und Frede (2005) können Schwankungen unter 5 kg/ha LF auch auf zufällige Fehler zurückgeführt werden. Die angestrebte Minimierung von Unsicherheiten konzentriert sich daher zunächst auf wichtige Bilanzglieder wie die Mineraldüngung und die Abfuhr mit dem Raufutter. Für andere Bilanzglieder wird zunächst die relative Bedeutung für die Bilanzberechnung betrachtet. Beispielsweise wird die Strohabfuhr nicht berücksichtigt, einerseits aufgrund fehlender statistischer Daten, andererseits weil es sich bei der Verwertung als Einstreu i.d.R. durch die Rückführung von Festmist um einen geschlossenen Kreis-

lauf handelt. Nach Schätzungen des Arbeitskreises Lager Hase werden allerdings 10 % des Strohertrages in diesem Gebiet durch Geflügelbetriebe genutzt und teilweise als Hühnertrockenkot über längere Distanzen in andere Regionen transportiert. Rechnerisch würde sich dadurch eine zusätzliche Abfuhr von 1 kg N/ha LF ergeben.

3 Verbesserte Abschätzung unsicherer Bilanzglieder

3.1 Stickstoffabfuhr durch Raufutter

Da für Erträge von Grünland, Feldgras, Klee gras und Luzerne keine ausreichend genauen Statistiken vorliegen und zudem die N-Gehalte im Erntegut stark schwanken können, wird ein Verfahren für die plausible Schätzung der N-Abfuhr mit dem Grundfutter entwickelt. Obwohl für Silomais plausible Ertragsdaten auf Kreisebene vorliegen, wird dieser aus systematischen Gründen in das Raufutter (Grundfutter) einbezogen. Das gleiche gilt für andere Feldfutterpflanzen wie Futterrüben und Nebenfutterflächen (z. B. verfütterte Zwischenfrüchte). Die Ganzpflanzenernte kann bei diesen Futterbauverfahren erhebliche N-Abfuhrmengen zur Folge haben, die deutlich über 200 kg N/ha betragen können. Im Folgenden wird keine exakte Bestimmung der tatsächlichen Mengen vorgenommen, sondern ein Weg zur plausiblen Schätzung der N-Abfuhr mit dem Raufutter vorgeschlagen. Die angenommenen Grundfuttermengen und Nährstoffgehalte müssen in einem konsistenten Verhältnis zum Grundfutter verwerten den Tierbestand, der zusätzlich zum Grundfutter eingesetzten Menge an Kraftfutter, den berechneten tierischen Nährstoffausscheidungen und den aus dem Betrieb exportierten tierischen Produkten stehen. Die Schätzung einer Stallbilanz kann somit zur Gewährleistung der Bilanzwahrheit im N-Flächenbilanzansatz beitragen. Die folgende Formel beschreibt die den weiteren Kalkulationen zugrunde liegende Beziehung:

N-Aufnahme Raufutter fressender Tiere (Grund- und Kraftfutter) = tierische N-Ausscheidungen
 + N-Menge in der Milch
 + N-Menge im Lebendgewichtszuwachs der Tiere

Daraus folgt:

N-Aufnahme aus eigenerzeugtem Raufutter durch Raufutter fressende Tiere (innerbetrieblich erzeugtes Grundfutter) = tierische N-Ausscheidungen
 + N-Menge in der Milch
 + N-Menge im Lebendgewichtszuwachs der Tiere
 - N-Aufnahme aus Kraftfutter und zugekauftem Grundfutter

Die von den Tieren über das Grundfutter aufgenommenen N-Mengen unterscheiden sich von den Brutto-N-Erträgen der Hauptfutterfläche, da nur die verwertete Futtermenge betrachtet wird. Letztere entspricht der tatsächlichen Abfuhr in der N-Flächenbilanz, wenn man die Futterverluste bzw. die N-Austräge über Silagesaft vernachlässigt. Für die tierischen N-Ausscheidungen liegen bereits Schätzwerte vor. Dagegen fehlen Werte für zugekaufte Futtermittel und Kraftfutter aus Eigenproduktion sowie für die in tierischen Produkten exportierten N-Mengen. Diese Größen müssen daher geschätzt werden.

3.1.1 Export tierischer Produkte

Der Export tierischer Produkte wird je Tierkategorie und bei Rindern je Großvieheinheit (GV) und je kg Milchleistung mit Hilfe einer einfachen Überschlagsrechnung abgeschätzt (s. Tabelle 3). Grundlage bilden Koeffizienten aus der Musterverwaltungsvorschrift zur Umsetzung der Düngverordnung von 1996 und Annahmen zum Fleischzuwachs. Für Milch wird ein N-Gehalt von 5,3 g/kg bei 3,4 % Proteingehalt angenommen, für Rindfleisch ein Wert von 25,6 g/kg bei 16 % Proteingehalt.

Tabelle 3:

Parameter zur Schätzung des N-Exports über tierische Produkte Raufutter fressender Tiere

Tierkategorie	Rinder-GV pro Stallplatz	kg N pro GV und Jahr (durch Fleischzuwachs)
Milchkühe	1	2,0
Bullen	0,6	16,0
Kälber (unter 6 Monaten)	0,3	13,0
Färsen	0,6	10,0
Andere Kühe	1	2,0
		kg N pro Tier und Jahr (durch Fleischzuwachs)
Pferde		3,4
Schafe		1,5
		kg N/kg Milch
Milch		0,0053

Quelle: Eigene Darstellung.

3.1.2 Kraftfuttereinsatz und Zukauf von Grundfutter

Grundlage der Berechnungen bildet eine Analyse von 4.440 einzelbetrieblichen Buchführungsabschlüssen von niedersächsischen Futterbaubetrieben der Jahre 1999/2000 und 2000/2001, die von der LandData GmbH in anonymisierter Form für wissenschaftliche Zwecke bereitgestellt wurden. Der Datensatz enthält die Flächen-nutzung in Hektar, naturale Erträge der Verkaufsfrüchte, Viehzahlen, verkaufte Milchmenge, monetäre Aufwen-

dungen für Kraftfutter und Grundfutter (differenziert nach Rindern, Schafen, Pferden, Schweinen, Geflügel) sowie den monetären Wert innerbetrieblich verwerteter Verkaufsfrüchte (Getreide, Hülsenfrüchte). Zur Überprüfung der Schätzwerte wurde auf veröffentlichte Hoftorbilanzen von Anger (1997) und Scheringer und Isselstein (2000 und 2001) sowie auf die durch das Ingenieurbüro INGUS erhobenen, anonymen Hoftorbilanzen aus dem Pilotgebiet Große Aue zurückgegriffen.

Zur Quantifizierung des Kraftfuttereinsatzes wurden die monetären Werte des Kraftfutterzukaufs für Rinder sowie des innerbetrieblich erzeugten und verfütterten Getreides und der Hülsenfrüchte ausgewertet. Der Zukauf von Grundfutter wird in den Kraftfutterzukauf einbezogen, da er in der Summe der einzelbetrieblichen Buchführungsabschlüsse unter 5 % der Summe der Ausgaben für den Zukauf von Kraft- und Grundfutter für Rinder beträgt. Während für den Kraftfutterzukauf Daten für die Rinder vorlagen, wurde das innerbetrieblich erzeugte Futtergetreide mit dem Anteil der Rinder-GV an allen Großvieheinheiten gewichtet, um eine Näherung an die Menge der Futtermittel zu erhalten, die tatsächlich für Rinder verwendet wurden. Damit wurde die Berechnung um das von Schweinen, Schafen, Geflügel und Pferden gefressene Kraftfutter bereinigt. In den untersuchten, spezialisierten Futterbaubetrieben stellen die Rinder-GV über 90 % an allen gehaltenen Großvieheinheiten, so dass diese Aufteilung wenig Einfluss auf das Ergebnis hat. Zur Umrechnung monetärer Werte in Stickstoffmengen wurde in Anlehnung an Osterburg et al. (2004) ein Wert von ca. 7,5 Euro pro kg Stickstoff in Futtermitteln verwendet. Für den vorliegenden Datensatz entspricht diese Relation dem Preis und den N-Inhaltsstoffen von Futtergerste. Die durchschnittlichen N-Mengen im Kraftfutter dürften auf Grundlage dieser Annahme eher unter- als überschätzt werden.

Mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells wurde die durchschnittlich zu erwartende Kraftfuttermenge pro Rinder-Großvieheinheit abgeleitet. Für das Modell wurden der Anteil von Milchvieh, Bullen und Kälbern an den Rinder-GV sowie die Milchmenge und die tierischen Ausscheidungen bezogen auf die Hauptfutterfläche als Indikator für die Viehbestandsdichte als erklärende Variablen verwendet. Das Modell ergab keine signifikant von Null unterschiedenen Schätzparameter zur Bestimmung des Kraftfuttereinsatzes für Färsen und Mutterkühe. Die Milchleistung wurde unter der Annahme einer entsprechenden Grundfutterleistung mit der über 3.000 kg pro Kuh und Jahr liegenden Menge ins Modell eingeführt. Die folgende Tabelle 4 gibt die Ergebnisse der Modellschätzung wieder. Das Bestimmtheitsmaß des gemäß F-Test signifikanten Modells beträgt 0,44. Dies bedeutet, dass durch das Modell nur ein Teil der vorhandenen Varianz erklärt wird. Es wird aber angenommen, dass die Schätzgleichung für die

Ermittlung des Mittelwerts in Betriebsgruppen bzw. in Regionen hinreichend genau ist.

Tabelle 4:

Koeffizienten zur Schätzung des Kraftfuttereinsatzes für Rinder (n = 4.440 Futterbaubetriebe; $R^2 = 0,44$)

	Schätzkoeffizient kg Kraftfutter-N pro Einheit und Jahr	Irrtumswahrscheinlichkeit (%)
Milchkuh-GV	11,3	9,1 %
Milchmenge über 3.000 kg/Kuh in kg	0,0086	2,3 %
Bullen-GV	23	6,1 %
Kälber-GV	30	14,4 %
N-Ausscheidung Raufutter fressender Tiere in kg N/ha Hauptfutterfläche	0,039	4,6 %

Quelle: Eigene Darstellung.

Die dargestellten Kalkulationen zur Abschätzung von Kraftfuttereinsatz und Exporten über tierische Produkte können unter Nutzung der ermittelten Formeln auf die Gemeindeebene übertragen werden und ermöglichen so die Berechnung plausibler N-Entzüge mit dem Raufutter. Neben dem tatsächlich an die Raufutter fressenden Tiere verfütterten Grundfutteraufkommen kann es bei der Futterwerbung oder beim Weidegang zu Verlusten kommen. Verluste, die auf der landwirtschaftlichen Nutzfläche verbleiben, sind nicht als Abfuhr anzusehen. Weitere Verluste treten während der Lagerung und aufgrund von Futterresten auf. Ein großer Teil der N-Mengen aus nicht verfütterten Verlusten gelangt mit dem Wirtschaftsdünger wieder auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen. Nur ein geringer Teil des N in Grundfutterkonserven geht durch gasförmige Verluste verloren, vor allem als Ammoniak. Diese Menge dürfte deutlich unter 5 % der ermittelten N-Abfuhr durch Grundfutter bleiben und liegt damit im Schwankungsbereich der Schätzung, die aufgrund der Annahmen zur N-Menge im Kraftfutter tendenziell zu einer Überschätzung der verfütterten Grundfuttermenge führt. Überregionaler Handel mit Raufutter wird aufgrund fehlender Daten in der Bilanzrechnung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Betriebsdatenanalyse haben gezeigt, dass Raufutterimporte in den betrachteten Futterbaubetrieben nur eine geringe Bedeutung haben.

3.2 Stickstoffzufuhr durch N-Mineraldünger

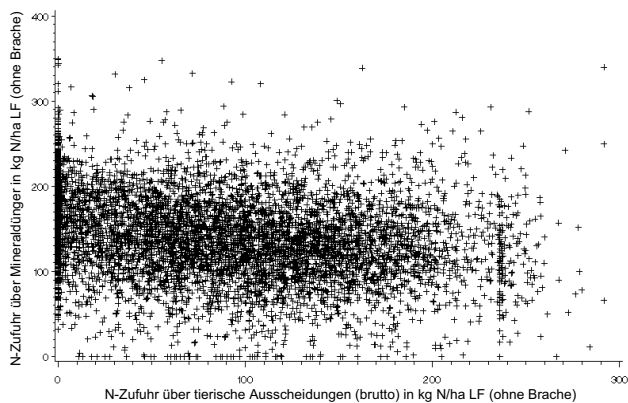
Für die regional eingesetzten N-Mineraldüngermengen lagen keine statistischen Daten vor. Deshalb wurde auf Grundlage von über 6.607 Buchführungsabschlüssen niedersächsischer landwirtschaftlicher Betrieben, die Angaben zu den eingesetzten, naturalen Düngermengen

enthalten, ein auf regionale Datensätze übertragbares Modell zur Schätzung des N-Mineraldüngereinsatzes entwickelt. Dabei wurde auf den Schätzansatz für Mineraldünger von Bach et al. (2003) sowie auf Vorarbeiten von Osterburg et al. (2004) aufgebaut. Zur Berechnung der aus den Betriebsdaten ableitbaren N-Bilanzgrößen wurden die gleichen Koeffizienten wie für die regionale Bilanzierung verwendet. Die Schätzung der N-Abfuhr mit dem Grundfutter erfolgt unter Berücksichtigung des jeweiligen betrieblichen Bestands an Raufutter fressenden Tieren, der Kraftfutterzukäufe und der innerbetrieblich erzeugten Kraftfuttermengen. N-Gehalte in den verschiedenen Mineraldüngerarten wurden, soweit nicht in den Buchführungsdaten abgelegt, anhand von Informationen über Mineraldünger in Broschüren zur Umsetzung der Düngeverordnung sowie von Herstellerangaben über handelsübliche Düngemittel ergänzt.

Als N-Mineraldüngereinsatz wurde die in den zwei betrachteten Wirtschaftsjahren zugekaufte, mit dem jeweiligen N-Gehalt gewichtete N-Mineraldüngermenge zugrunde gelegt. Ausgewertet wurden nur Betriebe mit präzisen Angaben zur Art des gekauften Mineraldüngers. Für die legume N-Bindung wurden pauschale Werte verwendet, wobei dem Wert für Grünland mit einer N-Bindung in Höhe von 30 kg/ha aufgrund der hohen Flächenumfänge eine besondere Bedeutung zukommt. Weitere Bilanzelemente wie atmosphärische N-Deposition, Stickstoff aus Klärschlamm und Kompost wurden aufgrund fehlender Daten nicht berücksichtigt. Da auf nicht genutzter Flächenstilllegung (Brache) weder gedüngt noch eine pflanzliche Abfuhr erzielt wird, wurden die Bilanzwerte auf die genutzte Fläche ohne Brache bezogen.

Abbildung 1 zeigt, dass die Mineraldüngermenge je Hektar auch bei gleicher Höhe tierischer Ausscheidungen in erheblichem Maße zwischen den Betrieben variiert, bei zunehmendem N-Aufkommen aus der Tierhaltung aber tendenziell abnimmt. Die Standardabweichung des Mineraldüngereinsatzes je Hektar liegt in Betriebsgruppen, die nach Spezialisierung (Marktfrucht, Futterbau, Veredlung, Gemischt) und Menge tierischer Ausscheidungen je Hektar (in 50-kg-Schritten) geschichtet wurden, im Mittel bei 48 kg N/ha oder 35 % bezogen auf die jeweilige mittlere Mineraldünger-N-Zufuhr. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der hohen Streuung kommt auch Hege (2003) auf Basis der Analyse von einzelbetrieblichen Hoftorbilanzen aus Bayern.

Die Koeffizienten des Schätzmodells werden in Tabelle 5 vorgestellt. Positive Vorzeichen der Koeffizienten bedeuten, dass die Variable zu einem steigenden, zu erwartenden Mineraldüngereinsatz beiträgt, negative Werte senken den geschätzten Mineraldüngereinsatz. Neben einem Mehrbedarfskoeffizienten von 1,33 zur Berechnung des Nährstoffbedarfs aus der Abfuhr, der einer Mineraldünger-



Quelle: Eigene Berechnungen auf Grundlage von Buchführungsabschlüssen niedersächsischer Betriebe (Mittelwert der Wirtschaftsjahre 1999/2000 und 2000/2001).

Abbildung 1:

Streuung des betrieblichen N-Mineraldüngereinsatzes in Abhängigkeit von der Höhe tierischer Ausscheidungen (n = 6.607)

anrechnung von 75 % entspricht, wurden Koeffizienten für das Aufkommen an Stickstoff aus der Rinderhaltung, der Schweinehaltung sowie von sonstigen Tieren ermittelt. Da die Anrechnung von Stickstoff aus der Rinder- und Schweinehaltung bei zunehmendem Aufkommen tendenziell zunimmt, wurde eine zusammengesetzte, nichtlineare Formulierung gewählt, die aus einem linearen und einem logarithmierten Glied besteht. Der natürliche Logarithmus (LN) des N-Aufkommens aus der Rinder- bzw. Schweinehaltung je Hektar erhält im Modell ein positives Vorzeichen. Bei geringem Dungaufkommen resultiert dadurch eine geringe oder keine Anrechnung des organischen Dungs aus der Rinder- und Schweinehaltung.

Der prozentuale Schätzfehler der Koeffizienten liegt für die legume N-Bindung, N aus der Schweinehaltung sowie

die Bodenklimazahl (BKZ) besonders hoch. Bezüglich der legumen N-Bindung, die in erster Linie aus dem Grünlandanteil resultiert, ist anzunehmen dass sich in dem Schätzfehler auch Unsicherheiten über die Anrechnung von Rinderdung niederschlagen. Die Berücksichtigung der regionalen Bestandsdichte von Schweinen pro Hektar LF trägt der Tatsache Rechnung, dass in einer Schätzung ohne diese endogene Variable die N-Mineraldüngung in den Futterbau- und Marktfruchtbetrieben, die in Veredlungsregionen liegen, deutlich überschätzt wurde. In Veredlungsbetrieben zeigte sich allerdings kein entsprechender, systematisch geringerer N-Mineraldüngereinsatz. Der geringere Einsatz von N-Mineraldünger in Futterbau- und Marktfruchtbetrieben der Veredlungsregionen kann z. B. durch Wirtschaftsdüngerimporte erklärt werden. Durch die Aufnahme der Schweinebestandsdichte als Indikator für Veredlungsregionen wurde die Modellschätzung insgesamt verbessert. Da Wirtschaftsdüngerimporte aufgrund fehlender Informationen für die Einzelbetriebe im Modell nicht direkt berücksichtigt werden konnten, erscheint die gewählte Vorgehensweise grundsätzlich sinnvoll.

Das Bestimmtheitsmaß des gemäß F-Test signifikanten Modells beträgt 0,27. Ein großer Teil der vorhandenen Varianz des N-Mineraldüngereinsatzes wurde somit durch die einbezogenen Variablen nicht erklärt. Aufgrund der hohen Streuung der tatsächlichen Einsatzmengen liegen 80 % der beobachteten Werte in einem weiten Bereich von +/- 50 kg Mineraldünger-N/ha um den geschätzten Wert (vgl. Abbildung 2). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Abbildung Abweichungen für Einzelbetriebe wiedergibt. Entscheidend ist aber, wie gut die Schätzung im Mittel von Betriebsgruppen ausfällt, da die regionale Bilanzierung auf Basis von Betriebsgruppen berechnet wurde.

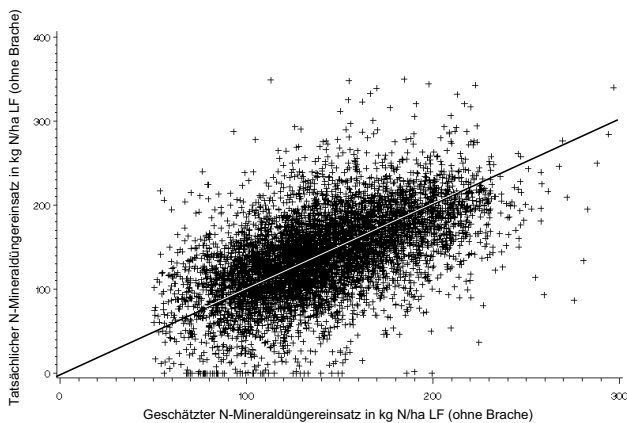
Tabelle 5:

Koeffizienten zur Schätzung des Mineraldüngereinsatzes pro Hektar (LF ohne Brache) (n = 6.607, $R^2 = 0,27$)

	Endogene Variablen	Koeffizient	Durchschnittswert der Variablen	Geschätzter mineralischer N-Einsatz	Irrtumswahrscheinlichkeit (%)
1	N-Abfuhr (kg N/ha)	1,33	124,3	165,1	0,5 %
2	Legume N-Bindung (kg N/ha)	-0,357	10,3	-3,7	69,4 %
3	N von Rindern (kg N/ha)	-0,591	58,8	-34,7	5,1 %
4	N von Schweinen (kg N/ha)	-0,184	30,0	-5,5	47,6 %
5	N von sonstigen Tieren (kg N/ha)	-0,849	0,8	-0,7	12,9 %
6	LN von 3 (LN von kg N/ha) *	4,748	2,7	13,0	1,8 %
7	LN von 4 (LN von kg N/ha) *	1,990	1,6	3,1	8,4 %
	Regionale Bodenklimazahl				
8	(BKZ) Regionale Anzahl Schweine/ha	0,203	43,0	8,7	38,9 %
9	LF	-2,897	3,0	-8,7	2,8 %
	Geschätzter Mineraldüngereinsatz (kg N/ha)			136,6	

* Summe aus 3 und 6 sowie aus 4 und 7 bleibt immer ≤ 0 (also kein Mehrbedarf aufgrund von N aus Dung)

Quelle: Eigene Berechnungen auf Grundlage von Buchführungsabschlüssen niedersächsischer Betriebe (Mittelwert der Wirtschaftsjahre 1999/2000 und 2000/2001).



Quelle: Eigene Berechnungen auf Grundlage von Buchführungsabschlüssen niedersächsischer Betriebe (Mittelwert der Wirtschaftsjahre 1999/2000 und 2000/2001).

Abbildung 2:

Abweichungen zwischen beobachtetem und geschätztem N-Mineraldüngereinsatz (Diagonallinie entspricht beobachtetem = geschätztem Wert) ($n = 6.607$, $R^2 = 0,27$)

Eine Überprüfung unterschiedlicher Schichtungen nach Betriebsstruktur und regionaler Zugehörigkeit sowie die umfassende Analyse der Residuen (Differenz zwischen beobachteten und durch das Modell berechneten Werten) ergab, dass für Betriebsgruppen der Mittelwert der Schätzung nicht systematisch von der tatsächlich beobachteten Ausprägung der Mineraldüngung abweicht. Für große Betriebsgruppen bzw. Regionen steigt die Treffsicherheit des Modells deutlich an: Bei einer Betriebsgruppengröße von 200 liegt der durchschnittliche Differenzbetrag zwischen Schätzung und Beobachtung unter 5 kg N/ha, und nur 7 % der untersuchten Betriebsgruppen weisen Abweichungen über 10 kg N/ha auf. Werden statt Einzelbetrieben Gruppen mit über 50 Beobachtungen betrachtet, lässt sich ein Bestimmtheitsmaß für die Modellschätzung von $R^2 = 0,8$ errechnen.

Die Diskussion der ermittelten Schätzwerte in den Pilotgebietskooperationen und der Vergleich mit anderen Daten ergaben für die Gebiete Große Aue und Ilmenau-Jeetzel keine wesentlichen Abweichungen. Die vorläufigen Ergebnisse für das Gebiet Lager Hase wurden kontrovers diskutiert, weil Daten aus der Kontrolle der Düngeverordnung deutlich geringere N-Mineraldüngermengen je Hektar auswiesen. Um den in verschiedenen Datensätzen beobachtbaren, verringerten Mineraldüngereinsatz in Veredlungsregionen besser zu berücksichtigen, wurde die Variable „regionale Schweinebestandsdichte“ in das Schätzmodell eingeführt.

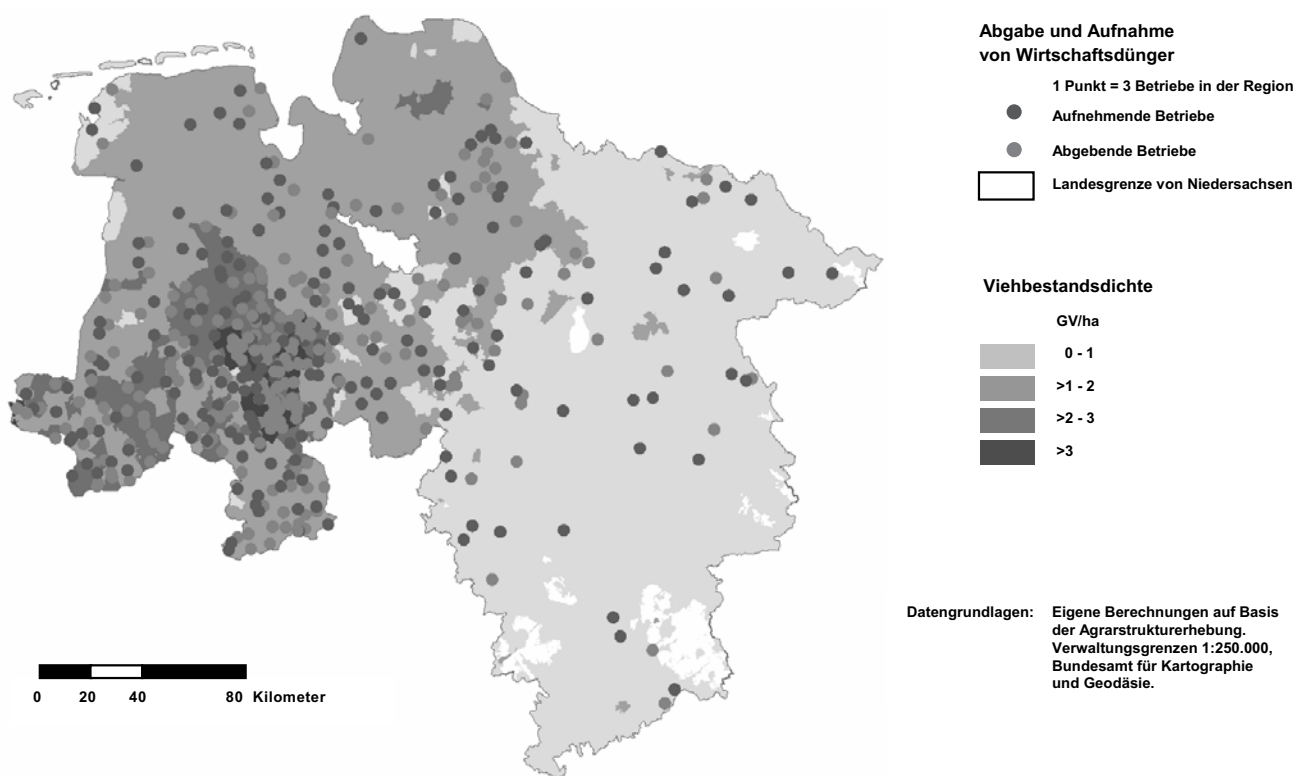
3.3 Überbetriebliches Wirtschaftsdüngermanagement

Wirtschaftsdüngerexporte sind vor allem auf Beschränkungen der Ausbringungsmenge pro Hektar gemäß Dün-

geverordnung zurückzuführen. Dabei wird der Einsatz von Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft auf Ackerland auf 170 kg N/ha*a begrenzt, weiterhin gelten Beschränkungen für hoch mit Phosphor versorgte Böden. Darüber hinaus kann die überbetriebliche Verteilung des organischen Düngers auch unter betriebswirtschaftlichen Gesichtspunkten sinnvoll sein. Im Jahr 2003 gaben bei einer repräsentativen Befragung in Niedersachsen ca. 7 % der Betriebe an, Gülle abzugeben, während ca. 6 % Gülle übernommen haben. Aus einer Hochrechnung für Gesamt-Niedersachsen geht hervor, dass viehstarke Betriebe (ca. 13 % aller GV) an Betriebe mit hoher Flächenausstattung und insgesamt ca. 8 % der LF liefern (StBA, 2004). Die regionale Verteilung orientiert sich an der Viehdichte (vgl. Karte 1), sowohl für die abgebenden als auch für die aufnehmenden Betriebe, d.h. ein überregionaler Transfer findet offenbar nur in geringem Umfang statt und dürfte sich bei weiteren Entfernungen auf Geflügeltrockenkot beschränken. Statistische Mengenangaben über den Wirtschaftsdüngerhandel liegen nicht vor. Berechnet man die N-Mengen aus tierischen Ausscheidungen, so liegen diese auf Gemeindeebene zum Teil über den geltenden Ausbringungsobergrenzen. In den betreffenden Gemeinden wurde diese N-Menge als Export abgezogen und den Regionen zugeschlagen, in denen laut Statistik aufnehmende Betriebe liegen. Diesem Verfahren liegt die Annahme zugrunde, dass die Höchstgrenzen eingehalten werden, also kein Vollzugsdefizit bezüglich den Vorgaben der Düngeverordnung vorliegt.

Der Gülleexport aus viehstarken Betrieben in viehschwache ist nur dann eine im Sinne des Wasserschutzes sinnvolle Maßnahme, wenn der Ausnutzungsgrad der Nährstoffe durch die bessere Verteilung ansteigt, oder wenn eine räumliche Verlagerung von Überschüssen erwünscht ist, z. B. im Fall von Wasserschutzgebieten. Die Analysen in Abschnitt 3.2 weisen auf eine bessere Ausnutzung des Wirtschaftsdünger-N in Betrieben mit höherer Viehbesatzdichte hin. Daher müssen Zweifel angemeldet werden, dass überbetrieblicher Wirtschaftsdüngereinsatz automatisch zu einer Verbesserung der N-Ausnutzung führt.

Aus Sicht der Pflanzenernährung überrascht dieses Ergebnis, denn es ist davon auszugehen, dass die technische Verwertbarkeit von N aus Wirtschaftsdünger bei zunehmenden Einsatzmengen abnimmt. Das tatsächliche Düngemanagement in Betrieben mit höheren Viehbesatzdichten unterscheidet sich aber offenbar von Betrieben mit geringeren Tierbestandsdichten. Das unterschiedliche Betriebsleiterverhalten kann damit erklärt werden, dass beim Einsatz größerer Wirtschaftsdüngermengen die Nährstoffwirkung für den Betriebsleiter leichter erkennbar sein dürfte als bei geringen Einsatzmengen, und eine bessere Nährstoffanrechnung bei höheren Einsatzmengen durch Mineraldüngereinsparung auch betriebswirtschaftlich stärker ins Gewicht fällt. Diese Gründe können zu



Quelle: Eigene Berechnungen aus Daten der Agrarstrukturerhebung 2003.

Karte 1:

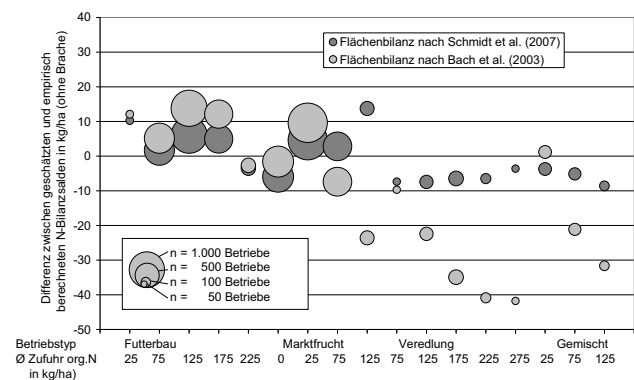
Übernahme von Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft in Niedersachsen (Repräsentativerhebung 2003)

einem vergleichsweise effizienteren Management des Wirtschaftsdüngers in Betrieben mit überdurchschnittlicher Viehbesatzdichte beitragen.

3.4 Analyse der Verbesserungen der N-Bilanzschätzung

Zur Überprüfung der entwickelten Methode wurde die N-Flächenbilanzmethode nach Bach et al. (2003) und die in diesem Beitrag vorgestellte Methode nach Schmidt et al. (2007) anhand von Berechnungen mit einzelbetrieblichen Daten verglichen. Die überbetriebliche Wirtschaftsdüngerverwertung wird dabei nicht berücksichtigt. Es werden Betriebsgruppen unterschiedlicher Spezialisierung und mit unterschiedlichem Aufkommen an N aus tierischen Ausscheidungen betrachtet. Durch Korrekturfaktoren wurde sichergestellt, dass beiden Schätzmethoden derselbe durchschnittliche Mineraldüngereinsatz zugrunde liegt. Die Schätzergebnisse beider Methoden weisen nach der Korrektur die gleichen, durchschnittlichen Bilanzüberschüsse auf, unterscheiden sich aber bezüglich der Verteilung der Überschüsse zwischen den verschiedenen Betriebsgruppen. Ohne diese Korrektur würde die Mineraldüngerezufuhr nach der Methode von Bach et al. (2003) im Mittel aller über 6.000 Betriebe um ca. 20 % unterschätzt (vgl. Osterburg et al., 2004).

In Abbildung 3 werden die Abweichungen zwischen geschätzten und anhand der einzelbetrieblichen Daten berechneten N-Bilanzsalden dargestellt. In der Abbildung



* Positive Abweichungen bedeuten eine Überschätzung, negative eine Unterschätzung der empirisch abgeleiteten N-Salden durch die Flächenbilanzmethoden.

Quelle: Berechnung der Stickstoff-Flächenbilanz nach Bach et al. (2003) und nach Schmidt et al. (2007) auf Grundlage von Buchführungsabschlüssen niedersächsischer Betriebe (Mittelwert der Wirtschaftsjahre 1999/2000 und 2000/2001, für Betriebsgruppen mit 30 und mehr Betrieben, n = 6.413).

Abbildung 3:
Abweichungen zwischen geschätzten Bilanzsalden und auf Grundlage beobachteter Betriebsdaten berechneten Salden in Betriebsgruppen, geschichtet nach Betriebstyp und N-Aufkommen aus tierischen Ausscheidungen („Zufuhr org.N.“)*

wird deutlich, dass die Abweichungen von den beobachteten Werten durch die entwickelte Methode für die meisten Betriebsgruppen auf unter ± 10 kg N/ha verringert werden konnten. Im Vergleich zur Methode nach Bach et al. (2003) werden vor allem Veredlungs- und Gemischtbetriebe mit Schweinehaltung realistischer abgebildet. Wird das vorgestellte Schätzmodell auf Regionen mit spezialisierter Agrarproduktion übertragen, ergibt sich somit eine verbesserte Abbildung der regionalen N-Bilanzen.

4 N-Flächenbilanz für Niedersachsen

Tabelle 6 gibt einen Überblick über wichtige N-Bilanzglieder und weist die absoluten Werte für Niedersachsen sowie Angaben je Hektar LF aus. Die Netto-Mineralisation durch Melioration und Landnutzungswandel sowie die N-Deposition und Ammoniakverluste sind in dieser Aufstellung nicht berücksichtigt.

Die Flächenbilanz für Niedersachsen liegt im Jahr 2003 mit 126 kg N je ha knapp über dem Ergebnis von 1999. Hauptgrund dafür ist das schlechte Ernteergebnis (Abfuhr) in 2003 aufgrund von Trockenheit in den Sommermonaten.

Tabelle 6:
Stickstoff-Bilanzierung für Niedersachsen

		1999		2003		
		t	kg/ha LF ohne Brache	t	kg/ha LF ohne Brache	
1	tierische Aus- scheidungen	+	267.704	107	265.435	107
2	sonstige organi- sche Dünger	+	10.694	4	10.573	4
3	legume N-Bindung	+	27.068	11	25.468	10
4	Mineraldünger	+	329.275	131	317.726	128
5	Abfuhr	-	325.550	130	304.795	123
Saldo		=	309.191	123	314.407	126
Quelle: Eigene Berechnungen.						

Quelle: Eigene Berechnungen.

5 Weitere Stickstoff-Quellen und -Senken

Meliorierte Moorböden, Grünlandumbruch und atmosphärische Deposition von Stickstoff stellen N-Quellen dar, die neben den auf Grundlage jährlicher Stoffumsätze der Düngung und Ertragsbildung berechneten N-Bilanzsalden die regionalen N-Emissionen beeinflussen. Diese sind im Folgenden näher beschrieben. Veränderungen der im Boden gespeicherten N-Vorräte durch Humusauf- und -abbau, die nicht mit Melioration, Grünlandumbruch oder Grünlandetablierung zusammenhängen, wurden wegen fehlender Datenverfügbarkeit nicht berücksichtigt.

5.1 Melioration

Die Trockenlegung von Moorböden durch Dränung (Melioration) hat eine Mineralisation geogener, d. h. über sehr lange Zeiträume angereicherter N-Vorräte zur Folge, die aufgrund hoher N-Bodenvorräte über viele Jahre anhält. Auf der Grundlage mehrerer Untersuchungen hat das Niedersächsische Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie (LBEG) die durchschnittlichen Netto-Mineralisationsraten in Abhängigkeit des langjährigen mittleren Grundwasserniedrigstandes und der Nutzung als Acker oder Grünland aus der Bodenübersichtskarte 1:50.000 (BÜK 50) abgeleitet. Auf dieser Grundlage wurden die gemeindebezogenen Summenwerte ins Verhältnis zur landwirtschaftlichen Nutzfläche gesetzt, um die Größenordnung des Bilanzgliedes „Netto-Mineralisation von meliorierten Böden“ zu bewerten. Dabei zeigte sich, dass 50 % aller Gemeinden in Niedersachsen eine mittlere N-Freisetzung im Boden von unter 7 kg N/ha LF*a aufweisen, ca. 5 % der Gemeinden liegen über 47 kg N/ha LF*a. Wegen der in manchen Regionen erheblichen Mengen an mineralisiertem Stickstoff, die neben dem N-Flächenbilanzüberschuss die auswaschungsgefährdete N-Menge erhöhen, sollte diese Bilanzgröße näher untersucht und in Regionalbilanzen berücksichtigt werden.

5.2 Umbruch von Grünland

Auch die Einsaat und der Umbruch von Grünland führen zu starken Veränderungen der N-Vorräte im Boden. Bei Umwandlung von Acker in Grünland werden N-Überschüsse aus der Düngung, der legumen N-Bindung und der atmosphärischen Deposition im Boden akkumuliert. Bei Grünlandumbruch werden im Boden festgelegte N-Mengen in so kurzer Zeit mineralisiert, dass die pflanzenbauliche Verwertbarkeit dieser N-Mengen an Grenzen stößt. Da diese Freisetzung zumindest in Teilen aus den N-Bilanzüberschüssen der jüngeren Vergangenheit stammt, können diese N-Mengen aber nicht einfach zur regionalen N-Bilanz hinzuaddiert werden, da sonst bei mehrjähriger Betrachtung Doppelzählungen auftreten.

Eine fundierte Analyse des Landnutzungswandels ist nur auf Grundlage von GIS-Daten möglich, die eine flächenexplizite Auswertung über zwei Zeitpunkte erlauben. Die Daten der Agrarstatistik sind dafür keine geeignete Grundlage, weil lediglich die Netto-Flächenveränderungen auf Gemeinde- oder Kreisebene, aber keine parzellenscharfen Nutzungsveränderungen ausgewiesen werden. Für den ersten Zeitpunkt wurde das erste digitale Landschaftsmodell (Basis-DLM) ausgewählt, bereitgestellt vom Bundesamt für Kartographie und Geodäsie (BKG) im Jahr 2000. In diesem Datensatz liegen die Erhebungszeitpunkte für die Flächen in Niedersachsen zwischen

dem 07.07.1993 und dem 22.11.1996. Der Vergleichsdatensatz ist die Grundkarte des neuen InVeKoS-GIS aus dem Jahr 2004 (bereitgestellt vom Niedersächsischen Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie). Somit wurde die Nutzungsänderung in einer Zeitspanne von etwa 10 Jahren verglichen. In den untersuchten Pilotgebieten wurden während dieser 10 Jahre zwischen 20 und 50 % des Grünlandes umgebrochen, während eine Neuanlage von Grünland nur auf Flächenumfängen von 5 - 10 % des ursprünglich vorhandenen Grünlands stattfand.

Abgeleitet von Gäth et al. (1997) werden ca. 560 kg N jährlich auf einem Hektar Grünlandumbruch mineralisiert. Ein Teil dieses Nährstoffes wird von der Folgefrucht verwertet, der Rest wäscht aus oder entweicht gasförmig. Die Anteile der Austragspfade aus dem System „Boden“ sind sehr standort- und managementabhängig und können hier nicht genau quantifiziert werden. Die N-Immobilisationsrate bei Grünland-Ansaat nach Ackernutzung kann in Anlehnung an Gäth et al. (1997) auf 75 kg N/ha*a geschätzt werden.

Weit geringere gemessene Auswaschungsraten als die berechneten N-Verluste lassen vermuten, dass der Stickstoff zu großen Teilen gasförmig entweicht (vgl. Dressel und Jung, 1983). Dennoch bergen die hohen Auswaschungsraten ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotenzial hinsichtlich der Gewässerqualität.

5.3 Atmosphärische Deposition

Große Unsicherheiten bestehen bei der Berechnung der atmosphärischen N-Deposition. Während Depositionsraten von über 70 kg/ha*a gemessen wurden, die die gasförmige, partikuläre und nasse Deposition berücksichtigen (Böhme und Russow, 2002), zeigt eine flächendeckende Kartierung in Deutschland Werte zwischen 10 und 52 kg/ha*a für Nass-, Trocken- und Feuchtd deposition (Gauger, 2002). Die Depositionsraten für die landwirtschaftlichen Flächen niedersächsischer Gemeinden lagen zwischen 14 und 41 kg N/ha*a (durchschnittlich 25 kg N/ha LF). Dieser Wert entspricht einem Anteil von etwa 20 % am gesamten N-Überschuss auf landwirtschaftlichen Flächen

Niedersachsens. Insgesamt gelangen ca. 68.000 Tonnen Stickstoff aus der Atmosphäre in den landwirtschaftlichen Kreislauf. Diese Menge resultiert zum einen aus der Landwirtschaft selbst, durch Ammoniak-(NH₃-) Verluste und zum anderen aus Verkehr, Industrie und Hausbrand (UBA, 2008). Trotz der außerlandwirtschaftlichen Einträge „exportiert“ der Agrarsektor mehr Stickstoff (ca. 74.000 t NH₃-N-Verluste pro Jahr, durchschnittlich 28 kg N/ha LF), als in agrarische Flächen eingetragen wird. Stickstoffdeposition findet hauptsächlich in Forstflächen statt und kann dort langfristig diffuse N-Austräge ins Grundwasser verursachen.

6 Vergleich der N-Emissionsquellen

Tabelle 7 enthält die berechneten N-Emissionen für Niedersachsen sowie eine Auswertung nach Gemeindeaggregaten. Neben den absoluten Zahlen für Niedersachsen (in Tonnen) weist diese Aufstellung die prozentualen Anteile an den berechneten Gesamtemissionen sowie Durchschnittswerte je Flächeneinheit in kg/ha LF*Jahr aus. Das Minimum der Gemeinden bedeutet, dass in mindestens einer Gemeinde Niedersachsens dieser Emissionswert auftritt, und zwar als durchschnittliche Angabe der gesamten landwirtschaftlichen Nutzfläche (LF) pro Hektar und Jahr. Der Median beschreibt das mittlere Niveau über alle Gemeinden und die Quantile zeigen die Bandbreite, innerhalb derer die Werte in 90 % aller Gemeinden liegen (5 %- bis 95 %-Quantil).

Die Schätzung zum Einfluß der Landnutzungsänderung dokumentiert im Wesentlichen die N-Mobilisation nach Grünlandumbruch. Nur wenige Gemeinden weisen einen negativen Wert auf, d.h. die Immobilisation bei Grünland-Neuansaat überkompensiert die N-Freisetzung durch Grünlandumbruch. Betrachtet man die letzten 10 bis 15 Jahre agrarischer Entwicklung in Niedersachsen und den damit verbundenen Rückgang des Grünlandes, so stellt die N-Freisetzung durch Landnutzungsänderung ein relevantes Belastungspotenzial dar, das in Teilen aus akkumulierten N-Überschüssen der jüngeren Vergangenheit gespeist wird.

Tabelle 7:

Stickstoffemissionen landwirtschaftlicher Flächen (ohne Brache) in Niedersachsen 1999 (Insgesamt und Gemeindeaggregate)

	Niedersachsen		Gemeinden					
	t	%	kg/ha LF*a					
			Ø	Min	Max	Median	5 %-Quantil	95 %-Quantil
Bilanzsaldo	218.534	68	82	20	137	84	50	122
Deposition	68.389	21	25	14	41	23	16	36
Melioration	34.619	11	13	0	239	6	0	47
Landnutzungsänderung	103.050		39	-77	475	27	-5	129

Quelle: Eigene Berechnungen.

7 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Entwicklung von Schätzmodellen auf Grundlage von Betriebsdaten eine regional differenzierte Stickstoffbilanzierung ermöglicht und dabei gegenüber der bisher verbreiteten Berechnungsmethode für die regionale N-Flächenbilanz (Bach et al., 2003) Unschärfen und Unsicherheiten reduziert werden können. Die Analyse der Betriebsdaten deutet auf eine sehr hohe Variabilität der Nährstoffeffizienz hin, d.h. der Umsetzung von N-Zufuhr in pflanzliche Erträge. Eine treffsichere Abschätzung des tatsächlichen Düngungsgeschehens ist aufgrund der hohen Varianzen nur eingeschränkt möglich. Eine weitere Schlussfolgerung ist, dass in vielen Betrieben eine weitere Effizienzverbesserung möglich sein dürfte. Inwieweit eine solche Verbesserung erzielt werden kann und mit Hilfe welcher Maßnahmen, ist Gegenstand weiterer Arbeiten, die u.a. im EU-LIFE-Vorhaben WAgriCo durchgeführt werden (NLWKN, 2006).

Teil der laufenden Arbeiten ist auch die Schätzung der Wirkung bereits umgesetzter Maßnahmen und deren Abbildung im Emissionsmonitoring. Eine Übertragbarkeit der Methode auf andere Regionen hat zur Voraussetzung, dass regional disaggregierte Daten der Agrarstatistik sowie Betriebsdaten verfügbar sind. Für das Untersuchungsgebiet „Niedersachsen“ lagen mehrere tausend Betriebsabschlüsse für zwei Wirtschaftsjahre vor. Vor dem Hintergrund hoher Varianzen insbesondere bei der Mineraldünger-Zufuhr sind große Stichproben Voraussetzung für die Ableitung von Schätzmodellen.

Die gegebenen Unsicherheiten können weiter reduziert werden, indem auf das gesamte erhobene Datenpotenzial zurückgegriffen wird (Daten der Agrarstrukturerhebung, Buchführungsabschlüsse, Düngeverordnungskontrolldaten, Güllebörse, Aufzeichnungen zur Kompost- und Klärschlammverwertung sowie Gärreste aus Biogasanlagen und Geflügeltrockenkot aus dem benachbarten Ausland). Solange diese Daten nicht oder nur teilweise zur Verfügung stehen, sollte versucht werden, die entstandenen Unsicherheiten zu quantifizieren.

Bei der energetischen Nutzung landwirtschaftlicher Biomasse entstehen neue Nährstoffströme, denen künftig verstärkt Beachtung bei der Nährstoffbilanzierung geschenkt werden sollte. Beispiele sind die Biogasproduktion und die Verwertung der Gärreste sowie die Strohverbrennung. Ein Problem stellt die fehlende oder unvollständige statistische Erfassung der Biomasse-Stoffströme dar.

Für die Erreichung der Ziele der EU-Wasserrahmenrichtlinie stellt eine gute flächenhafte Bilanzierung die Grundlage für weitergehende Untersuchungen dar. An die regional differenzierten und zeitlich aufgelösten N-Salden soll eine hydrologische Modellierung anschließen, die die potenzielle Nitratkonzentration in den Sicker-, Grund- und

Oberflächengewässern schätzt (vgl. Kunkel und Wendland, 2006) und somit den Aufbau einer Kausalkette ermöglicht.

Literatur

- Anger M (1997) Hoftorbilanzierung konventioneller und extensiver Grünlandbetriebe des Mittelgebirgsraumes. VDLUFA-SchR 46:347-350
- Bach M, Grimm M, Frede HG (2003) Berechnung von Stickstoff-Flächenbilanzen für Gemeinden – Beispiel Hessen. Wasser und Boden 55(7/8):120-126
- Bach M, Frede H-G (2005) Methodische Aspekte und Aussagemöglichkeiten von Stickstoff-Bilanzen. Bonn : FNL, 55 p, Schriftenreihe des ILU 9
- BGK - Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V. (2005) Verbrauch von Düngemitteln in Deutschland und Substitutionspotential von Kompost [online]. Zu finden in http://www.bgkev.de/infodienste/artikel.htm?kat=verschiedenes&nfoid=04_4_273 [zitiert am 28.02.2008]
- BML - Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (1996) Muster-Verwaltungsvorschrift für den Vollzug der Verordnung über die Grundsätze der guten fachlichen Praxis beim Düngen vom 26.01.1996 (BGBl. I S. 118)
- Böhme F, Russow R (2002) Formen der atmosphärischen N-Deposition und deren Bestimmung in Agrarökosystemen unter besonderer Berücksichtigung der 15N-Isotopenverdünnungsmethode (ITNI) Stickstoff - ein Nährstoff aus dem Gleichgewicht. UFZ-Bericht 16:6-17
- Dämmgen U (ed) (2007) Calculations of emissions from German agriculture — National Emission Inventory Report (NIR) 2007 for 2005. Braunschweig : FAL, Landbauforsch Völknerode SH 304/304A
- Döhler H, Eurich-Menden B, Dämmgen U, Osterburg B, Lüttich M, Bergschmidt A, Berg W, Brunsch R (2002) BMVEL/UBA-Ammoniak-Emissionsinventar der deutschen Landwirtschaft und Minderungsszenarien bis zum Jahre 2010. Berlin : Umweltbundesamt, 191, 39, 45 p, Texte Umweltbundesamt 02/05
- Dressel J, Jung J (1983) Nährstoffverlagerung in einem Sandboden in Abhängigkeit von der Bepflanzung und Stickstoffdüngung (Lysimeterversuche), Landwirtsch Forsch 36:363-372
- EEA - European Environment Agency (2004) EMEP/CORINAIR Emission Inventory Guidebook. Copenhagen
- Gäth S, Anthony F, Becker K-W, Geries H, Höper H, Kersebaum C, Nieder R (1997) Bewertung des standörtlichen Denitrifikations- und Mineralisations/Immobilisations-Potentials von Böden. Mitt Dtsch Bodenkundl Ges 85:1373-1376
- Gauger T (2002) Flächendeckende Kartierung der Gesamtdeposition von Stickstoff in Deutschland. UFZ-Bericht 16:72-89
- Hege U (2003) Bewertung von Stickstoffsalden auf Betriebsebene – ein Lösungsvorschlag : DLG-Kolloquium, 03.12.2003 in Bonn [online]. Zu finden in <http://download.dlg.org/pdf/koll/hege.pdf> [zitiert am 28.02.2008]
- Kunkel, R, Wendland, F (2006) Diffuse Nitratreinträge in die Grund- und Oberflächengewässer von Rhein und Ems. Jülich : Forschungszentrum, 124 p, Schriften des Forschungszentrums Jülich : Reihe Umwelt 62
- Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz, Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung (2005) Grobkonzept Grundwassermonitoring : chemischer und mengenmäßiger Zustand für Grundwasserkörper in Niedersachsen/Bremen ; Stand: Mai 2005 [online]. Zu finden in http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C12456386_L20.pdf [zitiert am 28.02.2008]
- Niedersächsisches Landesamt für Statistik (2003a) Bodennutzung und Ernte 2003
- Niedersächsisches Landesamt für Statistik (2003b) Tierische Erzeugung 2003 - Schlachtungen, Milcherzeugung und -verwendung, Brut, Schlupf und Schlachtungen von Geflügel, Legehennenhaltung und Eiererzeugung

- Niedersächsisches Landesamt für Statistik (2004) Besondere Ernteermittlung 2003
- NLWKN - Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (2006) WAgriCo-Projekt-Zwischenbericht [online]. Zu finden in <http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C38838826_L20.pdf> [zitiert am 17.04.2008]
- NLWKN und NLFb - Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz; Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung (2005) Grobkonzept – Grundwassermonitoring : chemischer und mengenmäßiger Zustand für Grundwasserkörper in Niedersachsen/Bremen [online]. Zu finden in < http://cdl.niedersachsen.de/blob/images/C12456386_L20.pdf> [Zitiert am 22.04.2008]
- Osterburg B, Schmidt TG, Gay SH (2004) Auswertung betrieblicher Daten zur Ermittlung des Stickstoffmineraldünger-Einsatzes : Endbericht für ein Forschungsvorhaben im Auftrag des Niedersächsischen Umweltministeriums. Braunschweig : FAL, 42 p, Arbeitsber Bereich Agrarökonomie 2006/06
- Scheringer J, Isselstein J (2000) Zur Variabilität der Stickstoffeffizienz in Futterbaubetrieben Niedersachsens. Mitt AG Grünland Futterbau 2:125-128
- Scheringer J, Isselstein J (2001) Nitrogen budgets of organic and conventional dairy farms in north-west Germany. Grassland Sci Europe 6:284-287
- Schmidt TG, Osterburg B, Laggner A (2007) Datenauswertung zur Quantifizierung diffuser Stickstoffemissionen aus der Landwirtschaft im Rahmen des Projekts „Integriertes Monitoring des chemischen Zustandes des Grundwassers“ in Niedersachsen : Top-Down-Ansatz mit Daten der Agrarstrukturerhebungen 1999 und 2003 und Analyse des Landnutzungswandels. Braunschweig : FAL, 88p, Arbeitsbericht Bereich Agrarökonomie 2007/02
- Statistisches Bundesamt (2004) Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft in landwirtschaftlichen Betrieben : Agrarstrukturerhebung 2003, Fachserie 3 / Reihe 2.2.2
- UBA - Umweltbundesamt (2008) Umweltdaten Deutschland Online, Emissionen von Luftschadstoffen, Emissionen ausgewählter Luftschadstoffe nach Quellgruppen in Deutschland 1990 bis 2005 [online]. Zu finden in <http://www.umweltbundesamt-umwelt-deutschland.de/umweltdaten/public/document/downloadImage.do?ident=9253> [Zitiert am 22.04.2008]

Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats

Karen Aulrich¹ and Kerstin Barth¹

Abstract

The aim of the present study was the monitoring of the dairy goat herd of the Institute of Organic Farming for intramammary infections (IMI) caused by coagulase-negative staphylococci (CNS) over an entire lactation. The effect of IMI on somatic cell count (SCC) of goat's milk was investigated. A total of 64 German Improved Fawn goats were sampled. Foremilk samples were taken three times during lactation, at the beginning, in the early stage and at the end of lactation. The udder halves (n = 342) were analysed for somatic cell count (SCC) and for species identification by PCR. Therefore PCR methods based on species-specific 16S - 23S ribosomal RNA spacer sequences were used as well as internal transcribed spacer PCR (ITS-PCR). DNA was directly isolated from milk samples. The prevalence of IMI caused by CNS decreased during lactation from 33 % of infected animals to 15 % at the end of lactation. The most prevalent specific pathogen observed in the herd was *Staphylococcus epidermidis*. Other identified bacteria were *S. xylosus*, *S. simulans* and *S. caprae*. The prevalence of CNS infections in both half udders were similar. SCC increased with stage of lactation. The parity had no significant effect on SCC in the presented investigation. Infected udder halves had significant higher levels of SCC than uninfected halves (2.35 vs. 3.02, $P < 0.01$). It was observed that the udder halves respond not independent. If one half was infected with CNS the SCC of the non-infected udder half was influenced and tended to increase. This fact should be also taken into account as well as all other known factors influencing the SCC in goat's milk in the establishment of criteria for evaluation of goat's milk quality.

Keywords: goats, mastitis, coagulase-negative staphylococci, somatic cell count, Organic Farming

Zusammenfassung

Euterinfektionen durch koagulase-negative Staphylokokken und ihre Auswirkungen auf die Zellzahl von Ziegenmilch

Das Ziel der vorgestellten Studie ist das Monitoring intramammärer Infektionen (IMI), hervorgerufen durch koagulase-negative Staphylokokken, der Milchziegenherde des Instituts für Ökologischen Landbau über eine Laktationsperiode. Der Effekt intramammärer Infektionen auf die somatische Zellzahl (sZZ) von Ziegenmilch wurde untersucht. Es standen 64 Ziegen der Rasse Bunte Deutsche Edelziege zur Verfügung. Während der Laktation wurden dreimal Vormelkproben entnommen, zu Beginn, im frühen Stadium der Laktation und am Ende der Laktation. In den Proben aus den Euterhälften (n = 342) wurden die sZZ bestimmt und die Bakterienspezies mittels PCR identifiziert. Hierfür kamen Methoden zum Einsatz, die auf spezie-spezifischen ribosomalen Spacersequenzen des 16S-23S RNA-Genes beruhen wie auch Methoden der ITS-PCR. Die DNA wurde direkt aus der Milch isoliert. Die Prävalenz durch CNS hervorgerufener IMI verringerte sich während der Laktation von 33 % infizierter Tiere auf 15 % infizierter Tiere am Ende der Laktation. Der am häufigsten vorkommende spezifische Erreger in der Herde war *Staphylococcus epidermidis*. Als weitere Erreger wurden *S. xylosus*, *S. simulans* und *S. caprae* identifiziert. Die Prävalenz von CNS Infektionen in beiden Euterhälften war ähnlich. Die sZZ stieg während der Laktation an. Die Laktationsnummer hatte keinen signifikanten Einfluss auf die sZZ. Infizierte Euterhälften hatten signifikant höhere sZZ als nichtinfizierte (2.35 vs. 3.03, $P < 0.01$). Es wurde festgestellt, dass die Euterhälften bei einer Infektion nicht unabhängig voneinander reagieren. Wenn eine Hälfte mit CNS infiziert ist, so ist die sZZ der anderen, nichtinfizierten Hälfte beeinflusst und zeigt tendenziell höhere Werte. Diese Feststellung und alle weiteren bekannten Faktoren, die die sZZ in Ziegenmilch beeinflussen, müssen in Betracht gezogen werden, wenn es um die Festlegung von Kriterien zur Bewertung der Qualität von Ziegenmilch geht.

Schlüsselwörter: Milchziegen, Mastitis, koagulase-negative Staphylokokken, Zellzahl, Ökologischer Landbau

¹ Johann Heinrich von Thünen-Institut, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Institute of Organic Farming, Trenthorst 32, 23847 Westerau/Germany; Email: karen.aulrich@vti.bund.de

1 Introduction

Intramammary infections (IMI) caused by coagulase-negative staphylococci (CNS) are increasing during the last years. IMI in dairy goats play an important role like in dairy cows. The relevance of IMI in dairy goats is not only an economic issue but also an hygienic and safety issue with respect to the bacteriological quality of milk.

The coagulase-negative staphylococci (CNS) are the most prevalent microorganisms in subclinical mastitis in goats (Contreras et al., 2003) ranging from 25 to 93 % of intramammary infections (Bergonier et al., 2003). Contreras et al. (2007) mentioned a prevalence of subclinical mastitis of 5 - 30 %. Among the CNS in dairy goats, *Staphylococcus caprae* was described as the most prevalent species followed by *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* and *S. simulans* (Bergonier et al., 2003). But the results are not consistent, however Moroni et al. (2005a; 2005b) found *S. epidermidis* as the most prevalent CNS species in two different investigations altogether including seven dairy farms in Italy. A previous study (Contreras et al., 1999) also reported high prevalence of *S. epidermidis* in a commercial dairy goat herd. The pathogenic importance of CNS in goats is still uncertain and the differences among the various CNS species are unclear.

The somatic cell count (SCC) represents a sensitive marker of udder health in dairy cattle and is a useful parameter to evaluate the relationship between IMI and changes in milk characteristics. SCC is widely used for evaluating milk quality. In the European Union (EU) a legal limit for SCC in cows bulk milk was established with 400.000 ml⁻¹ (EU, 1992). For goats no legal limit exists in the EU, in contrast the Food and Drug Administration in the United States defines 1.000.000 ml⁻¹ for goats. Nevertheless, the necessity for evaluation of milk quality exists also for goat milk. The transmission of findings from dairy cattle to small ruminants leads to errors in the diagnosis of subclinical IMI (Raynal-Ljutovac et al., 2007) and in the evaluation of goat's milk quality. SCC was controversial discussed in the literature. Attention should be paid to the fact that the geometric mean of SCC for healthy udder halves in goats was considerably higher than values obtained for other dairy ruminants (Luengo et al., 2004). The main aspects influencing SCC in goats were summarized recently (Contreras et al., 2007; Paape et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2007). However, because of important differences among dairy ruminants, mastitis control should be carefully made with a specific point of view to small ruminants (Contreras et al., 2007).

The objectives of the present study were to determine the occurrence of CNS in the dairy goat herd of the Institute of Organic Farming, to identify the CNS species by PCR based methods and to investigate the prevalence of the

species over an entire lactation. The influence of SCC on IMI caused by CNS should be examined.

2 Material and methods

The investigations were carried out on about 60 German Improved Fawn goats from the organically managed institute owned farm. Milk samples were taken during the first five days *post partum* (in March 2005, sampling day 0), in the early stage of lactation (sampling day 1) and at the end of lactation in December (sampling day 2). The milk samples from each udder half were collected aseptically after premilking and cleaning of the teat ends according to the standards of DVG (2000). Samples were kept at 4 °C until SCC analysis and at -20 °C until molecular biological analysis were performed.

SCC was determined in milk samples from sampling day 1 and 2 by the fluoro-opto-electronic method of the International Dairy Federation (IDF Standard 148A:1995) using the Fossomatic unit (FM 500 and FM 369, Foss Electric, Denmark). Samples from day 0 were excluded because of the special characteristics of colostrum. For statistical analysis, the SCC readings were normalized using the standard log₁₀ transformation.

Bacteria DNA for PCR analysis was directly isolated from the milk samples in the following way: 1 ml milk was centrifuged at 8.000 x g for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was washed twice with phosphate buffered saline and centrifuged at 12.000 x g for 5 min. After each centrifugation the supernatant was removed. The remaining pellet from the second centrifugation was subjected to lysis with a combination of Mutanolysin (Sigma, Germany) and Lysostaphin (Sigma, Germany) at 37 °C for 2 h. After centrifugation (12.000 x g, 5 min) the samples were incubated with Proteinase K for 16 h at 56 °C and further treated with the Tissue Kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the technical instructions. The remaining preparations were used as PCR templates.

The PCR reactions were performed using primer systems based on species specific 16S - 23S ribosomal RNA spacer sequences (Forsman et al., 1997) and developed for the detection of the main bovine mastitis pathogens (Tilsala-Timisjarvi et al., 2000). Table 1 shows in extracts the oligonucleotide primers for the detection of *S. epidermidis*, *S. simulans* and *S. xylosus*.

The amplifications were carried out in an iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). The thermal cycling conditions were a hot start (using Hot Start Polymerase, Qiagen, Germany) at the beginning at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. After the final cycle the preparation was kept at 72 °C for 10 min to complete the reaction.

Table 1:

Species-specific oligonucleotide primers from 16S-23S rRNA intergenic spacer region

Species	Primer	Sequence (5'-3')	Size of the main PCR product (bp)
<i>S. epidermidis</i>	Sta-Ep-F	TCT ACG AAG ATG AGG GAT A	240
	Sta-Ep-R	TTT CCA CCA TAT TTT GAA TTG T	
<i>S. simulans</i>	Sta-Si-F	ATT CGG AAC AGT TTC GCA G	220
	Sta-Si-R	ATT GTG AGT AAT CGT TTG CC	
<i>S. xylosus</i>	Sta-Xy-F	CTC ATT GGA GTA TTC AGT GC	350
	Sta-Xy-R	CTT ACA GCT CCC CAA AGC AT	

The analysis of other *Staphylococcus* spp., especially *S. caprae* occurred by internal transcribed spacer PCR (ITS-PCR) according to Couto et al. (2001) using primers G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') and L1 (5'-CAAGGCATC-CACCGT-3'). Amplification reaction was performed on a iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). The program consisted of an hot start at 95 °C for 15 min and 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 7 min, and extension at 72 °C for 2 min, followed by an additional extension step at 72 °C for 10 min (Jensen et al., 1993).

The PCR products were analysed by electrophoresis on 2 % agarose gels, however in case of the ITS-PCR products on 3 % gels, stained with ethidium bromide. The molecular size marker (marker VIII, Fermentas, Germany) was running concurrently. Gels were visualized under UV illumination (GelDoc2000, Bio-Rad Laboratories Inc., USA), photographed and saved.

3 Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SPSS 11.0 for Windows®. Univariate and stepwise backward analysis of variance was used to describe the influence of the infection status of udder halves and the parities on SCC. The animal was included as a random effect and the stage of lactation (DIM) as a covariate. The variable remained in the model if $p \leq 0.25$. The least square means were compared by the Bonferroni procedure.

4 Results and discussion

The numbers of sampled goats at different sampling days are shown in Table 2. The animals in the investigated herd were distributed over four parities.

The investigation of the whole dairy goat herd on CNS by PCR based methods showed a decrease of the prevalence of CNS during lactation. Whereas the prevalence within the first days *pp* averaged 33 % related to the sum of infected animals, the prevalence declined to 18 % after 57 days in milk (DIM) and to 15 % at the end of lactation

Table 2:

Number of sampled goats depending on parity and stage of lactation

DIM Median (Range) Sampling Day	2 (0 - 4) 0	57 (28 - 87) 1	263 (236 - 297) 2
Parity	Number of goats		
1	18	14	8
2	12	11	8
3	8	7	9
4	15	19	12

after 263 DIM. Among the 342 udder halves analysed, bacteria were detected in 51 samples. Across stage of lactation, 23 - 9.6 % of udder halves were infected from March to December. Higher rates of IMI caused by CNS were observed during the first days of lactation with 29 infected halves (Table 3). IMI's decreased to 13 infected halves in the early stage of lactation and to 9 udder halves infected with CNS at the end of lactation.

Table 3:

Number of goats and udder halves with and without CNS infection on different stages of lactation

DIM Median (Range)	Number of goats	CNS-infected animals	Number of udder halves	CNS-infected udder halves
2 (0 - 4)	64	21	128	29
57 (28 - 87)	60	11	120	13
263 (236 - 297)	47	7	94	9
Total	171	39	342	51

DIM = Days in milk

Among goats with IMI caused by CNS, 13 goats (62 %) had unilateral infections during the first days of lactation, the others had both half-udders infected. During early stage of lactation the rate with unilateral infections among infected animals increased to 81.8 % (9 goats) and

Table 4 :

Staphylococci isolated and prevalence of infection in left and right half udders on different sampling days during lactation

Species	DIM Median (Range)							
	2 (0 - 4)		57 (28 - 87)		263 (236 - 297)		Across lactation	
	Udder half		Udder half		Udder half		Udder half	
	Left (n = 64)	Right (n = 64)	Left (n = 60)	Right (n = 60)	Left (n = 47)	Right (n = 47)	Left (n = 171)	Right (n = 171)
Total CNS	14	15	6	7	5	4	25	26
<i>S. epidermidis</i>	9	6	6	4	5	1	20	11
<i>S. xylosus</i>	1	4	0	2	0	3	1	9
<i>S. simulans</i>	3	5	0	1	0	0	3	6
<i>S. caprae</i>	1	0	0	0	0	0	1	0

declined to 71.4 % (5 goats) at the end of lactation. The prevalence of CNS infections in left and right udder halves across lactation were similar on all tested days (Table 4) as well as described by Moroni et al. (2005b).

The IMI were caused by four *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. simulans* and *S. caprae*. From the 51 udder halves diagnosed with CNS infection, 31 (60.8 %) were identified as *S. epidermidis*, 10 (19.6 %) as *S. xylosus*, 9 (17.6 %) as *S. simulans* and only one half udder as *S. caprae* (Table 4). *S. epidermidis* was the most prevalent bacteria over the entire lactation with 15 infected udder halves during the first days after kidding, 10 in the early stage of lactation and 6 at the end of lactation. The infection caused by *S. caprae* disappeared during lactation. The data indicating *S. epidermidis* as the most prevalent bacteria are in confirmation with findings from Moroni et al. (2005a, b) and Deinhofer und Pernthaner (1995), but in contrast to Bergonier et al. (2003) who described *S. caprae* as the most prevalent species in goats. Furthermore, previous studies suggested that a high prevalence of *S. epidermidis* might be explained when teat dipping was not practiced (Contreras et al., 1997; Poutrel, 1984). These explanations could not be used for the results of the presented study because in the investigated herd teat dipping was a common practice. Therefore other explanations should be proved like the different competition of species during udder colonization. Further studies are necessary to point it out.

Several studies have demonstrated the capacity of CNS to persist, also during the dry period (Poutrel, 1984; Contreras et al., 1997). Our data until now demonstrated that only a small proportion of pathogens were persistent over the entire lactation in the investigated herd. The persistence was detected in four udder halves, two infected with *S. epidermidis* and two with *S. xylosus*, respectively. The studies should be continued with involvement of further lactations for the evaluation of the pathogen's behaviour.

Infection status of the udder, traditionally described as the most important factor affecting milk SCC (Luengo et al., 2004) was investigated as a further question of the study.

According to the statistical analyses the parity had no significant effect on SCC in the presented investigation in contrast to results from Paape et al. (2007) and Sanchez et al. (1999). Our results agree with findings from Zeng and Escobar (1995) who also stated that parity did not affect the SCC. Therefore the factor parity was excluded from the model. Figure 1 illustrates the logarithm of SCC in connection with the infection statuses on the two sampling days, whereas day one represents the data in the early stage of lactation and day two at the end of lactation. SCC tended to increase with stage of lactation. This

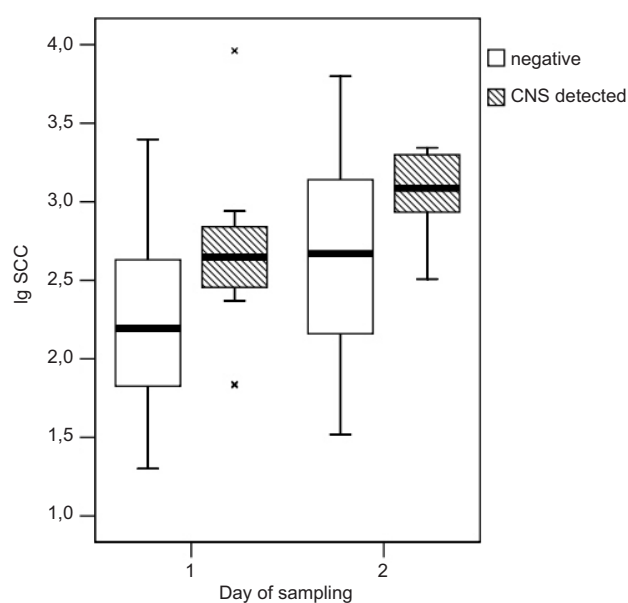


Figure 1:

The logarithm of SCC of early (1) and late (2) lactation milk samples in non-infected udder halves and halves infected with CNS

fact was also observed by other research groups (Luengo et al., 2004; Paape et al., 2007; Zeng und Escobar 1995; Min et al., 2007).

The mean SCC including infected and non-infected animals on day one was 2.28 (SD 0.52), increased to 2.70 (SD 0.61) on day two. The mean SCC in milk samples from udder halves that showed no infection with CNS on day one was 2.2 (SD 0.5), while the mean SCC from infected halves was 2.6 (SD 0.5). With increasing days in milk (mean = 263 days), the SCC in non-infected udder halves reached the level of infected udder halves on day 1 with 2.6 (SD 0.6). The SCC in CNS infected udder halves was 3.1 (SD 0.3) (Figure 1). It has been shown recently that SCC increased so strong with stage of lactation, that Moroni et al. (2005b) could not observe significant differences in SCC between healthy and infected animals at the end of lactation. Taking this fact and the own data into consideration, the independence of the udder halves' reactions should be proved. Flock and Zeidler (1968) investigated the degree of independence of udder quarters with respect to mastitis incidence in dairy cows and showed evidence that the quarters are affecting each other. Results of variance analysis are shown in Table 5. The least square mean (LSM) of SCC was 2.35 if both udder halves were non-infected with CNS. To consider the non-infected udder halves while the other half was infected with CNS, the LSM of SCC was 2.81 and tended to increase. LSM of SCC in infected udder halves whereas the other half was non-infected was 3.02 and significant different from non-infected udder halves ($P < 0.01$). If both udder halves were infected with CNS the LSM of SCC was 2.82 and not significant different from the other groups of tested halves. This fact should be proved in further investigations under consideration of more lactations and inclusion of more animals. Nevertheless, the data indicated the dependency of udder halves on each other with respect to the infection status.

Figure 2 illustrates the logarithm of SCC in early and late lactation milk samples of non-infected udder halves and of

udder halves affected by different CNS species. The difference between infected and non-infected halves showed a tendency to increase for all identified bacteria, except of *S. simulans*. The database for *S. simulans* was marginal ($n = 1$) during the investigated lactation and should be disregarded. As expected, SCC was lowest for non-infected udder halves (mean of both sampling days: 2.41). SCC was elevated in udder halves infected with *S. epidermidis* and *S. xylosum*, with 2.85 and 2.86, respectively. The differences were not significant. Among CNS, infections with *S. epidermidis* are associated with the highest values of SCC (Contreras et al., 1999; Deinhofer und Pernthaner, 1995). In contrast, recently Moroni et al. (2005a) observed differences in SCC increase among bacteria species. The SCC for infected udder halves with *S. caprae* was greater than with *S. epidermidis* and other CNS. The number of the remaining infected udder halves in the presented study was insufficient, therefore conclusions were not necessary with regard to that topic.

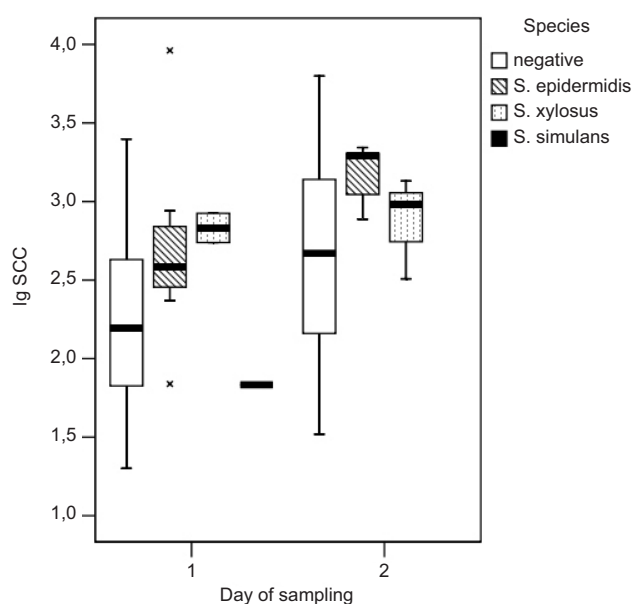


Figure 2:

The logarithm of SCC of early (1) and late (2) lactation milk samples in non-infected udder halves and in halves affected by different CNS species

Table 5:

Least square means (LSM) of SCC, standard error and confidence intervals in udder halves with different infection status

Status of udder halves	LSM	SE	Confidence interval (95 %)
Both non-infected	2.35 ^A	0.04	2.27 - 2.44
Non-infected halves, other infected	2.81 ^{A,B}	0.17	2.47 - 3.15
Infected halves, other non-infected	3.02 ^B	0.17	2.67 - 3.36
Both infected	2.82 ^{A,B}	0.23	2.37 - 3.28

^{A,B} Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.01$)

The presented data showed the highest SCC values regarding infections with *S. epidermidis* and *S. xylosum*. As well as Figure 1, Figure 2 reveals the increase of SCC for all detected bacteria species with the stage of lactation. Nevertheless, further studies are necessary to prove the data.

5 Conclusions

The study showed that *S. epidermidis* was the most prevalent species in the investigated herd. The prevalence of CNS decreased during lactation.

The data indicated the dependency of the udder halves with regard to their infection status. This fact needs further investigations with a higher number of animals.

It could be shown that any infection with CNS caused an increase of SCC in goat's milk as well as in cow's milk.

SCC increase was observed with stage of lactation.

The different factors influencing the SCC of goat milk should be taken into account if diagnostic thresholds will be defined for evaluation of milk quality.

References

- Bergonier D, de CR, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 34(5):689-716
- Contreras A, Corrales JC, Sanchez A, Sierra D (1997) Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J Dairy Sci* 80(11):2815-2819
- Contreras A, Luengo C, Sanchez A, Corrales JC (2003) The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest Prod Sci* 79(2-3):273-283
- Contreras A, Paape MJ, Miller RH (1999) Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. *Small Ruminant Res* 31(3):203-208
- Contreras A, Sierra D, Sanchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C (2007) Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Res* 68(1-2):145-153
- Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre H (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* 39(9):3099-3103
- Deinhofer M, Pernthaner A (1995) *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol* 43(2-3):161-166
- DVG - Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2000) Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern. Gießen : Verl der DVG, 57 p
- EU (1992) Directive 92/46 ECC Council
- Flock D, Zeidler H (1969) Zur Frage der Unabhängigkeit der Euterviertel im Mastitisgeschehen. *Z Tierzücht Züchtungsbiol* 85 (3):193-201
- Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T (1997) Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology-UK* 143:3491-3500
- Jensen MA, Webster JA, Straus N (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 59(4):945-952
- Luengo C, Sanchez A, Corrales JC, Fernandez C, Contreras A (2004) Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *J Dairy Res* 71(2):169-174
- Min BR, Tomita G, Hart SP (2007) Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats' milk. *J Dairy Res* 74(2):204-210
- Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, Boettcher P (2005a) Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J Dairy Sci* 88(5):1694-1704
- Moroni P, Pisoni G, Ruffo G, Boettcher PJ (2005b) Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Prev Vet Med* 69(3-4):163-173
- Paape MJ, Wiggins GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A, Moroni P, Miller RH (2007) Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Res* 68(1-2):114-125
- Poutrel B (1984) Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. *Vet Microbiol* 9(2):131-137
- Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, De Cremoux R, Gonzalo C (2007) Somatic cells of goat and sheep milk : analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Res* 68(1-2):126-144
- Sanchez A, Contreras A, Corrales JC (1999) Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. *Small Ruminant Res* 31(3):197-201
- Tilsala-Timisjarvi A, Forsman P, Alatossava T (2000) Bovine mastitis diagnosis from milk by a polymerase chain reaction-based method. *Milchwissenschaft* 55(9):488-492
- Zeng SS, Escobar EN (1995) Effect of parity and milk-production on somatic-cell count, standard plate-count and composition of goat milk. *Small Ruminant Res* 17(3):269-274

EC and CMT detect subclinical mastitis in dairy sheep but less sensitive than in dairy cows

Kerstin Barth¹, Elke Burow² and Karin Knapstein³

Abstract

Reliable tests to monitor the udder health of ewes are necessary to ensure a high raw milk quality in organic dairy sheep farms. 328 udder halves of 164 ewes from six organic farms were sampled in 2005. Foremilk samples were used to measure the electrical conductivity (EC) of the milk and for California Mastitis Test (CMT). Afterwards samples for cyto-bacteriological examination were aseptically collected. Pathogens were detected in 31 samples. In 24 cases coagulase-negative staphylococci caused the infection. Half udder samples free from pathogens contained 61.000 cells ml⁻¹ on average. According to the recommendations of the German Veterinary Association (DVG, 2002) for the evaluation of cytobacteriological results of cow milk samples, 73.0 % of the halves were healthy and 5.3 % had a subclinical mastitis. CMT values corresponded with the measured somatic cell count ($r = 0.53$, $p < 0.01$) and the mean EC difference between healthy and udder halves with subclinical mastitis was 0.4 mS cm⁻¹, nearly similar to the well known threshold for mastitis detection in cows.

Besides the bacteriological analysis we recommend to use 100,000 cells ml⁻¹ as a threshold to discriminate between healthy and mastitic halves and we have to say the common cow side tests are not so sensitive when applied to sheep milk.

Keywords: *mastitis, dairy sheep, somatic cell count, electrical conductivity, organic farming*

Zusammenfassung

Auch bei Schafen kann man mit der elektrischen Leitfähigkeit und dem Schalmtest subklinische Mastitis erkennen - jedoch weniger genau als bei Kühen

Die Sicherung einer hohen Milchqualität auch auf ökologisch wirtschaftenden Milchschaftbetrieben erfordert verlässliche Verfahren zur Eutergesundheitsüberwachung. Im Jahr 2005 wurden 328 Euterhälften von 164 Milchschaften, die auf sechs Öko-Betrieben gehalten wurden beprobt. An den Vorgemelksproben wurde die elektrische Leitfähigkeit (LF) der Milch gemessen und der Schalm-Mastitis-Test (SMT) ausgeführt. Für die zytobakteriologische Untersuchung wurden anschließend Anfangsgemelkproben steril gewonnen. In 31 Proben konnten Erreger nachgewiesen werden. In 24 Fällen wurde die Infektion von koagulase-negativen Staphylokokken verursacht. Der mittlere Zellgehalt von bakteriologisch negativ getesteten Proben betrug 61.000 Zellen ml⁻¹. Wurden die Euterhälften entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG, 2002) für Kuhmilch klassifiziert, so waren 73,0 % aller Hälften als gesund und 5,3 % als subklinisch an Mastitis erkrankt einzustufen. Die Ergebnisse des SMT wiesen eine Beziehung zur somatischen Zellzahl auf ($r = 0,53$, $p < 0,01$). Die LF-Differenz zwischen gesunden und subklinisch erkrankten Hälften betrug durchschnittlich 0,4 mS cm⁻¹ und entsprach damit annähernd dem in der Milchkuhhaltung angewendeten Grenzwert.

Für die Differenzierung zwischen gesunden und an Mastitis erkrankten Euterhälften bei Milchschaften empfehlen wir, neben der Durchführung der bakteriologischen Untersuchung, einen Zellzahlgrenzwert von 100,000 Zellen ml⁻¹ anzuwenden. Die im Milchkuhbereich üblichen Schnelltests sind bei Milchschaften nur eingeschränkt aussagefähig.

Schlüsselwörter: *Mastitis, Milchschafe, Zellzahl, Elektrische Leitfähigkeit, Ökologischer Landbau*

¹ Johann Heinrich von Thünen-Institut, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries (vTI), Institute of Organic Farming, Trenthorst 32, 23847 Westerau/Germany; Email: kerstin.barth@vti.bund.de

² University Kassel-Witzenhausen, Steinstr. 19, 37213 Witzenhausen/Germany

³ Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food (MRI), Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel/ Germany

1 Introduction

Infection of the udder is one of the most important diseases in dairy production. This concerns not only dairy cows but also dairy ewes. Tremendous losses of milk yield or a deteriorated raw milk quality might be caused by mastitis of lactating ewes (Behrens et al., 2001; Jaeggi et al., 2003; Bianchi et al., 2004). Cases of subclinical mastitis are of particular importance due to the fact that they can not be identified by the visual evaluation of the foremilk.

In cows the definition of udder health is based on cyto-bacteriological analysis of quarter milk samples. Since 1994 the threshold of 100,000 cells ml⁻¹ is used for somatic cell count (Table 1). Although it is required to apply this scheme only if three consecutive samples were gained, under a practical point of view it might be used for single samples, too, as long as the error rate will be considered.

Table 1:
Mastitis classification system recommended by DVG (1994)

Somatic cell count [1,000 ml ⁻¹]		
Pathogens*	≤ 100	> 100
not detected	normal secretion	unspecific mastitis
detected	latent infection	mastitis

* base: the same pathogen was detected in two out of three samples

However, a clear definition of udder health based on these parameters is still lacking in ewes. It is assumed that a higher somatic cell count (SCC) is physiological in sheep (Travniček & Federič, 1994; Tröger et al., 2003; Behrens et al., 2001). In contrast to the milk of goats, which contains cytoplasmatic particles making the automatic measurement difficult, sheep's milk contains the same classes of somatic cells as the milk of cows. Nevertheless, as long as no acute clinical mastitis occurs most of the farmers are afraid of the costs of a continuous monitoring by using cyto-bacteriological analyses. As an easy method SCC might be estimated using the well known California Mastitis Test (CMT). According to Winter (1998) and to McDougall et al. (2001) there is a positive and significant relationship between CMT and SCC in sheep milk, but these studies included cases of clinical mastitis. Thus, the question of the reliability for subclinical mastitis still remained. Honegger (1994) identified only 49 % of the infections using the CMT. However, that study involved only 11 ewes.

A second method to indicate subclinical mastitis without a laboratory analysis is the measurement of electrical conductivity (EC) of milk. Damages of the udder tissue cause an exchange of ions in the milk with an increase of sodium and chloride content leading to a higher EC (Haasmann & Schulz, 1994). Thus, EC of milk is not necessarily connect-

ed with the SCC: physical strain of the tissue might cause an increase of EC as well as pathogens (Barth, 2005). EC is negatively correlated with the milk fat content (Prentice, 1992). High fat contents constrain the movement of ions and the EC decreases. Peaker (1978) recommended comparing the EC readings of the udder quarters of the animal to achieve a high sensitivity. Due to the differences in milk composition and udder anatomy it is not clear if the findings made in cow's milk might be transferred to sheep.

This study aimed at an evaluation of CMT and EC measurement to monitor subclinical mastitis in sheep and was based on an investigation of the udder health status in German organic farms.

2 Materials and methods

Milk samples were gained once in six organic dairy sheep flocks during morning or evening milking in May, June or September 2005. Four of the herds were located in the middle and two in the North of Germany. 25 to 150 ewes were kept in the herds and a maximum of 30 animals per herd was randomly selected for sampling (Table 2). Animals with clinical mastitis were excluded.

Table 2:
Characteristics of the investigated flocks

Farm	Animals/herd	Sampled	Breed
1	30	25	Ostfriesian dairy sheep (black)
2	26	19	Ostfriesian dairy sheep (black)
3	150	30	Ostfriesian dairy sheep (white)
4	48	30	Ostfriesian dairy sheep (white)
5	44	30	Lacaune
6	60	30	Crossbreed (Ostfriesian dairy sheep x Lacaune)

Sampling always started with the left udder half. First squirts were used for EC measurement to avoid the well known effect of alveolarmilk ejection on the readings. EC was measured with a handheld conductometer (Mastitron® plus V, MILKU), which needs only 6 ml milk and compensates the measured EC on a standard temperature of 25 °C. After measuring EC the milk was transferred to the test plate for CMT. CMT was always carried out by the same person to improve the reliability of the evaluation. CMT scores were 0, +, ++ and +++ for "negative", "weak positive", "positive" or "strong positive", respectively. After cleaning the teats with towels soaked in 98 % alcohol 10 ml-samples for cyto-bacteriological analyses were gained aseptically. Afterwards an additional sample of 30 ml for analyses of milk composition was taken. After all the animals were machine milked according to the farm's routine.

Samples were stored and transported at 6 to 8 °C. Cyto-bacteriological analyses were carried out by the laboratory of the MRI in Kiel. SCC was measured by Fossomatic 360 and Fossomatic 5000 (A/S N Foss Electric, Hillerød, DK) according to IDF standard 148A: 1995, method C (IDF, 1995). Isolation, identification and quantification of mastitis pathogens followed the standard of German Veterinary Association (DVG, 2000). A sample was defined as tested positive for pathogens if at least 21 colony forming units (CFU) of the same pathogen were detected in 0.05 ml. In negative samples a pathogen could not be isolated. If more than two different pathogens or less than 21 CFU were detected the sample was considered as contaminated.

Fat and lactose contents were measured by infrared spectroscopy (Milkoscan FT 6000, A/S N Foss Electric, Hillerød, Denmark) at the laboratory of Landeskontrollverband Schleswig-Holstein, also located in Kiel.

SPSS 11.5 and 12.0 were used for statistical examinations. Calculations concerning SCC were based on Log10 transformation of SSC. Spearman's rank correlation coefficient was calculated for the relation between SCC and CMT. Measures of dispersion were expressed as mean and standard deviation.

3 Results and discussion

328 udder half samples were gained from 164 ewes. Animals were 10 to 270 days in milk (DIM) and in their first to ninth lactation. 10 samples for cyto-bacteriological analyses were contaminated and thus excluded from the statistical analysis. In 90.3 % of the 318 remaining samples no pathogen could be isolated. The prevalence of infection was very low compared to the results of Gonzalo et al. (2002), who detected an infection in 24.6 % of all sampled udder halves. The prevailing pathogens were coagulase-negative staphylococci: 7.5 % of all samples contained CNS. This goes along with the results of other studies (Honegger, 1994; Wittek et al., 1998; Ariznabarreta et al., 2002; Winter, 2003), which found CNS as the leading pathogen of udder infection in ewes. Only in 3 samples (0.9 %) major pathogens were detected: one sample each

contained *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* or Esculin-positive streptococci.

The SCC of 77.1 % of the 328 samples was lower or equal to 100,000 cells per ml milk. The geometric mean over all samples was 73,000 cells per ml. The prevalence of specific mastitis in the investigated herds was low. Only 5.3 % of all halves had an increased SCC caused by an infection (Table 3). The total amount of subclinical cases (unspecific and specific mastitis) was 22.6 % and corresponded with the findings by Gonzalo et al. (2002) who found 24.6 %, and was within the range from 10 to 25 % which was defined as normal by Behrens et al. (2001). Only a few udder halves showed SCC exceeding 1,000,000/ml (Figure 1). Last square means of SCC of uninfected and infected halves were 61,000 and 341,000 cell ml⁻¹, respectively. The difference was significant ($p < 0.05$).

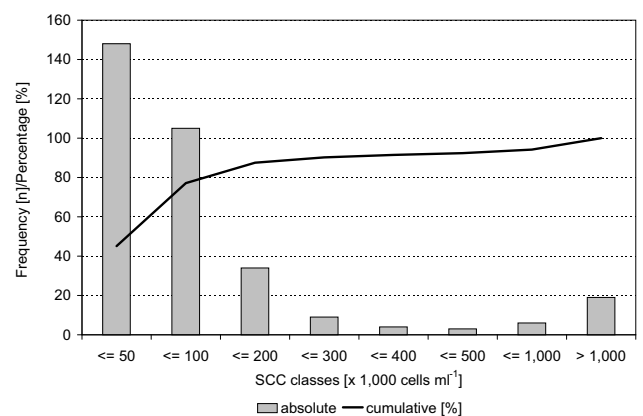


Figure 1:

Absolute frequency and cumulative percentage of samples (n=328) in classes of somatic cell count (SCC)

In view of these results, the usually recommended threshold of 500,000 cells ml⁻¹ (Travniček & Federič, 1994; Behrens et al., 2001; Tröger et al., 2003) seems to be too high to differentiate between healthy halves and halves with subclinical mastitis.

In respect to the very few infected halves and the low SCC, the status of udder health in the herds was very

Table 3:

Distribution of udder halves of ewes according to categories of udder health status based on quarter milk samples of dairy cows by DVG (1994)

Status	SCC [1,000 ml ⁻¹]	Pathogens	Frequency	
			n	%
normal secretion	≤ 100	not detected	232	73.0
latent infection	≤ 100	detected	14	4.4
unspecific mastitis	> 100	not detected	55	17.3
specific mastitis	> 100	detected	17	5.3
Total			318	100.0

Table 4:
Comparison between classes of SCC and CMT score

CMT Score	Somatic cell count [1,000 ml ⁻¹]				Total
	≤ 100	≤ 500	≤ 1,000	> 1,000	
0	244 (74.4)	33 (10.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	277 (84.5)
+	6 (1.8)	10 (3.1)	1 (0.3)	0 (0.0)	17 (5.2)
++	1 (0.3)	3 (0.9)	4 (1.2)	1 (0.3)	9 (2.7)
+++	2 (0.6)	4 (1.2)	1 (0.3)	18 (5.5)	25 (7.6)
Total	253 (77.1)	50 (15.2)	6 (1.8)	19 (5.9)	328 (100.0)

Table 5:
Characteristics of samples from udder halves of dairy ewes

		n	Mean	SD	Min	Max
SCC	[1,000 ml ⁻¹]	328	73	3.47	10	10,000
EC	[mS cm ⁻¹]	328	5.0	0.53	3.7	8.6
Fat	[%]	319*	6.09	2.05	2.18	15.99
Protein	[%]	319*	5.00	0.48	4.09	6.67
Lactose	[%]	319*	5.13	0.54	4.33	7.82

* milk yield of 9 udder halves was too low

good. The relatively high amount of halves with unspecific mastitis might be explained with the decrease of SCC after a successful defence against an infection or the beginning of a reaction during an infection. Furthermore it might be possible that rare pathogens could not be detected by the applied standard method. In the study of Gonzalo et al. (2002) all cases without an infection had a SCC below 200,000 cells ml⁻¹.

As expected, CMT was highly significant correlated with SCC ($r = 0.53$) and confirmed the results of Wittek et al. (1998), Winter (1998) and McDougall et al. (2001).

96.4 % of the cases with a SCC ≤ 100,000 cells ml⁻¹ were classified by CMT as “negative” and in 94.7 % of all samples containing over 1,000,000 cells ml⁻¹ CMT showed a clear reaction (Table 4). Consistent with Schalm (1960), the range between 100,000 and 500,000 cells ml⁻¹ was not clearly to define.

However, the CMT is a useful tool to monitor the udder health not only of dairy cows but also of dairy sheep. Main advantages of the CMT are the easy handling and the low costs (Wittek et al., 1998). Good results will be achievable if always the same person carries out the tests, because the evaluation might be influenced by changing persons especially in the most interesting range (Hamann, 1986).

Mean EC of all samples ($n = 328$) was 5.0 ± 0.56 mS cm⁻¹ with a wide variation between 3.7 and 8.6 mS cm⁻¹ (Table 5) due to different fat content. Calculation of EC differences between the halves of the udders resulted in a mean difference of 0.1 or 0.4 mS cm⁻¹ for udders with two

healthy ($n = 96$) or at least one half with specific mastitis ($n = 6$), respectively. This is in agreement with Fahr et al. (2003) and only 0.1 mS cm⁻¹ lower than the threshold recommended to detect quarters with subclinical mastitis in cows (Schulz, 1994). Maybe the reduced number of comparable readings (udder halves instead of udder quarters) impacted the sensitivity.

4 Conclusions

The status of udder health in the investigated herds was better than expected by considering the literature research.

The mastitis classification system (DVG, 2002) which is used for cows was useful to evaluate milk samples of dairy sheep, too. As in cows, we suggest to use the threshold of 100,000 cells ml⁻¹ to indicate subclinical mastitis. But the threshold should be tested using a larger number of animals.

To make a preselection und thus to reduce the costs for the cyto-bacteriological analysis of milk samples, it seems helpful to apply the CMT or to measure the EC of foremilk. A consistent documentation of the results per animal will give a good overview of the udder health status in the herd and will support other management decisions.

Acknowledgement

We would like to thank all participating farmers for helpfulness and patience during the days of milk sampling.

References

- Ariznabarreta C, Gonzalo C, San Primitivo F (2002) Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *J Dairy Sci* 85:1370-1375
- Barth K (2005) Differences in milk conductivity on quarter level induced by milking machine. *ICAR Technical series* 10:123-127
- Behrens H, Ganter M, Hiepe T (2001) Mastitis. In: Behrens H, Ganter M, Hiepe T *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. Berlin : Parey, pp 87-92
- Bianchi L, Bolla A, Budelli E, Caroli A, Casoli C, Pauselli M, Duranti E (2004) Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *J Dairy Sci* 87:2401-2408
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (1994) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Gießen : DVG, 78 p
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2000) Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern. Gießen : DVG, 57 p
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2002) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Gießen : DVG, 126 p
- Fahr RD, Schulz J, Kaskous S (2003) Merkmale der Eutergesundheit und deren Wechselbeziehungen bei Ostfriesischen Milchschaften : 8. DVG-Tagung der Fachgruppe „Krankheiten der kleinen Wiederkäuer“ am 24./25.06.2003 in Grub bei München ; Vortragszusammenfassung. *Tierärztl Prax* 31(G):61
- Gonzalo C, Ariznabarreta C, Carriedo JA, San Primitivo F (2002) Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J Dairy Sci* 85:1460-1467
- Hamann J (1986) Vergleichende Untersuchungen von Zellgehalt und Leitfähigkeit in Viertelanfangsgemelksproben. *Milchwissenschaft* 41:8-11
- Haasmann S, Schulz J (1994) Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes : laboridiagnostische Untersuchungen. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs H-W (eds) *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Jena : Fischer, pp 269-279
- Honegger R (1994) Eutergesundheit beim Milchschaft. Zürich : Univ, 71 p [Dissertation]
- IDF (1995) Milk : enumeration of somatic cells. Brussels : International Dairy Federation, pp1-6
- Jaeggi JJ, Govindasamy-Lucey S, Berger YM, Johnson ME, MCKusick BC, Thomas DL, Wendorff WL (2003) Hard ewe's milk cheese manufactured from milk of three different groups of somatic cell counts. *J Dairy Sci* 86:3082-3089
- MCDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D (2001) Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Res* 40:245-254
- Peaker M (1978) The electrical conductivity of milk for the detection of subclinical mastitis in cows : comparison of various methods of handling conductivity data with the use of cell counts and bacteriological examination. *Br Vet J* 134:308-314
- Prentice JH (1962) The conductivity of milk – the effect of the volume and degree of dispersion of the fat. *J Dairy Res* 29:131-139
- Schalm OW (1960) Ein neuer Mastitis-Test. *Tierärztl Umsch* 15:151-153
- Schulz J (1994) Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes : Diagnose und Prognose. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs H-W (eds) *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Jena : Fischer, pp 280-284
- Travnicek M, Federic F (1994) Euterkrankheiten der kleinen Wiederkäuer. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs H-W (eds) *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Jena : Fischer, pp 435-443
- Tröger F, Schulz J, Lengerken G von, Fahr RD, Rodehutsord M, Rost D, Heinrich J (2003) Schaf und Ziege : Besonderheiten von Bau des Euters und Physiologie der Laktation. In: Fahr RD, Lengerken G von (eds) *Milcherzeugung : Grundlagen, Prozesse, Qualitätssicherung*. Frankfurt a M : Deutscher Fachverl, pp 593-595
- Winter P (1998) Aspekte zur Diagnostik von Schafmilchproben. In: 6. DVG-Tagung der Fachgruppe „Krankheiten der kleinen Wiederkäuer“ zum Thema „Schaf- und Ziegenkrankheiten“ am 08.05.1998 in Gießen. Gießen : DVG, pp 34-40
- Winter P (2003) Eutergesundheit bei Milchschaften und –ziegen. *Tierärztl Prax* 31(G):61
- Wittek T, Elze K, Beck K (1998) Milchinhaltsstoffe, Zellgehalt, klinische und bakteriologische Euterbefunde im Verlauf der Laktation in einer Milchschaftherde. *Prakt Tierarzt* 79:762-768

Klimarelevanz des Ökologischen Landbaus - Stand des Wissens

Gerold Rahmann*, Karen Aulrich*, Kerstin Barth*, Herwart Böhm*, Regine Koopmann*, Rainer Oppermann*, Hans Marten Paulsen* und Friedrich Weißmann*

Zusammenfassung

Aus der Literaturrecherche geht hervor, dass es gegenwärtig unterschiedliche Aussagen zur Klimarelevanz des Ökolandbaus gibt. Die unterschiedlichen Aussagen hängen vom Produkt, von der Betrachtungsebene (Systemgrenzen) und der Produktionsstruktur/-intensität ab. Zusammenfassend kann aus den zitierten Studien geschlossen werden, dass der Ökologische Landbau weniger Treibhausgase freisetzt als vergleichbare konventionelle Systeme. Der höhere Ausstoß klimarelevanter Gase pro Hektar in der konventionellen Landwirtschaft wird vor allem durch zugekaufte und teilweise von Übersee importierte Futtermittel sowie durch die energieaufwändige Dünger- und Pestizidproduktion verursacht. Die höheren Erträge pro Tier- oder Flächeneinheit gleichen dies in der Regel nicht aus. Deswegen gilt die Aussage, dass der Ökolandbau grundsätzlich klimafreundlicher ist auch - wenn auch weniger ausgeprägt - bei einer produktbezogene Betrachtung. Im Vergleich zu integrierten Systemen unterscheidet sich die emittierte Menge an Treibhausgasen nicht. Vorteilhaft für integrierte Systeme sind insbesondere der reduzierte Pflanzenschutzmitteleinsatz, die Verwendung betriebseigener Stoffe (z.B. Futtermittel und Wirtschaftsdünger) als auch Stilllegungsflächen. Der Entwicklungsbedarf im Ökologischen Landbau besteht entweder in höheren Flächenleistungen oder einer weniger energieaufwändigen Produktion.

Nicht nur im Ökologischen Landbau sondern in allen Landbausystemen gibt es ein Optimierungspotenzial. Regenerative Energiesysteme und Nutzung lokaler Ressourcen sowie Managementoptimierung (bessere Aufwand-Ertrags-Relationen: Fütterung, Energie, Nährstoffe) sind in der Praxis selten ausgeschöpft. Ertragssteigerungen bei angemessener Steigerung der Mechanisierung wirken sich positiv auf eine Reduzierung des Treibhauspotenzials (pro Produktionseinheit) aus.

Schlüsselwörter: Klimawandel, Ökologischer Landbau, Treibhausgase

Abstract

Impact of organic farming on global warming - recent scientific knowledge

The review of recent literature on the contribution of organic farming to global warming shows different results. The inhomogeneous results are reasoned in different focuses of the studies looking at different products, system borders or production conditions and production intensities. In summary of the assessed studies can be stated that organic farming emits lower amounts of green house gases (GHG) than comparable conventional systems. Higher area bound GHG emissions in conventional agriculture are mainly reasoned in farm imported feedstuffs that are to a significant amount purchased from overseas. The consumption of products from energy intensive pesticide and fertiliser production is increasing the GHG emissions further. Higher yields per animal or per hectare unit are usually not able to compensate for these negative impacts. Therefore it can be concluded that organic farming is more climate friendly than normal conventional farming, also when product bound GHG loads are calculated. Whereas the emissions of integrated conventional systems are equal to organic systems. In the integrated systems reduced pesticide consumption, use of farm produced resources (e.g. feedstuff, livestock manure) and set asides are advantageous. GHG-balances of organic farming could be improved further by higher area yields or by reduction of energy consumption.

Global warming potential of all farming farm systems can be optimised and reduced in future. Renewable energy systems, use of local resources and progress in management skills (increase of input-output relations: feeding, energy-use, nutrients) are usually underdeveloped in practice. Yield increases with moderate increase in mechanisation normally lead to reductions in global warming potential per unit of agricultural product.

Keywords: global warming, organic farming

* Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei (vTI), Institut für Ökologischen Landbau, Trenthorst 32, 23847 Westerau/Germany; Email: oel@vti.bund.de

1 Einleitung

Jede Art der Lebensmittelproduktion trägt zur Emission von Treibhausgasen bei. Die Frage ist, wie viele Treibhausgase pro Produkteinheit freigesetzt werden. Hier gibt es große Unterschiede und erhebliches Einsparungspotenzial. Entscheidendes Kriterium für die Vorzüglichkeit eines landwirtschaftlichen Produktionsverfahrens oder besser noch der gesamten Wertschöpfungskette ist aber die Nachhaltigkeit. Nachhaltigkeit beinhaltet eine Fülle von Kriterien, welche zusammengefasst v. a. die Umweltverträglichkeit, Tiergerechtigkeit, Wirtschaftlichkeit (und soziale Akzeptanz) eines Systems beschreiben. Die Fokussierung auf einen einzelnen Aspekt (wie z.B. die Klimarelevanz als Teilmenge der Umweltverträglichkeit) ist nicht zielführend.

Bei der Diskussion um die Vorzüglichkeit von ökologischer versus konventioneller Lebensmittelproduktion muss deswegen die Multifunktionalität der Landwirtschaft beachtet werden. Wichtigste Funktion ist die Produktion von gesunden Lebensmitteln in ausreichender Menge bei schonender Nutzung der biotischen und abiotischen Ressourcen. Hinzu kommen die gesellschaftlichen Erwartungen an Tierschutz, Erhaltung der Landschaft und Wahrung ländlicher Traditionen in einer immer stärker von der Landnutzung und Lebensmittelproduktion entkoppelten und sich verstädtierenden Bevölkerung. Wie der konventionelle Landbau bereits seit mehreren Jahrzehnten, so steht auch der Ökologische Landbau heute vor den Herausforderungen, dieser Multifunktionalität gerecht zu werden. Der Klimawandel ist nur eine Komponente.

Trotz der vorteilhaften multifunktionalen Leistungen des Ökologischen Landbaus wird die Frage der Klimawirkung weiterhin kontrovers diskutiert. Dabei wird je nach Betrachtungswinkel (Systemgrenzen) und Zahlenmaterial unterschiedlich argumentiert. Dieses zu versachlichen, ist Ziel dieses Beitrages. Dabei wird auf den Stand der Wissenschaft und auf weitere Potenziale zur Reduzierung von Emissionen eingegangen.

2 Beitrag der Landwirtschaft am Klimawandel

Die deutsche Landwirtschaft trägt zu rund 6,3 % (weltweit 13,5 % in 2000) zum anthropogen induzierten Treibhauseffekt Deutschlands bei (Deutschland 2005: 133,2 Mio. t CO₂-Äquivalente, davon 56 Mio. t CO₂, 23 Mio. t CO₂-Äquivalente aus CH₄ (weltweit 502,2 Mio. t) und 54,2 Mio. t CO₂-Äquivalente aus N₂O (weltweit 711,6 Mio. t, UBA, 2007). Besonders hoch ist der Anteil der Landwirtschaft an der Gesamtemission bei N₂O (Lachgas) (weltweit: über 80 %, Isermann, 1994) und bei CH₄ (Methan) (weltweit 41 %, Heyer, 1994). Bei CO₂ (Kohlendioxid) ist der Anteil mit 21 % deutlich geringer (Tabelle 1). Seit 1990 sind die nationalen CO₂-Emissionen um 15,4 %, die Methan-Emissionen um 48,9 % und die N₂O-Emissionen um 21,5 % zurückgegangen. Die deutschen Treibhausgas-Inventare für den Bereich Landwirtschaft werden am vTI in Braunschweig geführt (UBA, 2007; Dämmgen, 2007).

Die Lebensmittelproduktion ist auch immer eine Funktion des Konsums. Gegenwärtig werden statistisch in Deutschland pro Einwohner und Jahr ca. 1,6 Tonnen CO₂-Äquivalente durch Lebensmittelproduktion und -konsum (Bedürfnisfeld Ernährung für das Konsumjahr 2000) freigesetzt (16 % der Gesamtemission pro Kopf und Jahr) (Wiegmann et al., 2005; ÖKO, 2007).

3 Studien zur flächen- bzw. produktbezogenen Klimarelevanz des Ökolandbaus

Im Ökologischen Landbau liegt ein geringeres Ertragsniveau auf den Flächen vor und es können pro Flächeneinheit weniger Tiere ernährt werden als im konventionellen Landbau. Der Tierbesatz pro Hektar entscheidet jedoch über die Flächenbilanz der Treibhausgase. Liegt z. B. doppeltes Ertragsniveau in konventioneller im Vergleich zur ökologischen Getreideproduktion vor, könnten auch doppelt so viele Tiere ernährt werden und auch die Treibhausgasemissionen pro Flächeneinheit verdoppeln sich. Die Ertragssituation ist jedoch sehr unterschiedlich. Nach BMELV

Tabelle 1:
Klimarelevante Emissionen der deutschen Landwirtschaft 2005 (in Mio. t CO₂-Äquivalenten)

Emissionsbereich	CO ₂	CH ₄	N ₂ O	Summe
Tierische Verdauung	-	18,3	-	18,3
Wirtschaftsdünger	-	5,0	3,1	8,1
Emissionen aus der Bodennutzung	42,4	-0,6	42,4	8,2
Bodenkalkung	1,7	-	-	1,7
Energieemissionen	6,7	0,0	0,1	6,8
Emissionen aus der N-Düngerherstellung	5,2	0,3	8,6	14,1
Summe Emissionen Landwirtschaft	56,0	23,0	54,2	133,2
Summe Emissionen alle Sektoren	885,9	51,4	66,4	1.003,7

Quelle: Zusammengestellt aus Dämmgen, 2007; Bundesdrucksache 16/5346.

(2007) war im Wirtschaftsjahr 2005/06 der Viehbesatz im Ökologischen Landbau mit durchschnittlich 0,69 Vieheinheiten ha^{-1} (VE) rund ein Viertel niedriger als auf vergleichbaren konventionellen Betrieben (0,89 VE ha^{-1}). Der Winterweizenantrag lag im Ökologischen Landbau bei 3,96 t ha^{-1} 42 % unter dem im konventionellen Landbau (6,87 t ha^{-1}). Durch die höheren Preise im Ökolandbau (2005/06: öko.: 196,60 € t^{-1} , konv.: 95,10 € t^{-1}) war in den letzten Jahren der monetäre Flächenantrag im Ökolandbau aber höher. Dieses spiegelt sich auch bei anderen Produkten wider. Gesamtbetrieblich haben Ökobetriebe 2006 mit 321 € ha^{-1} einen höheren Gewinn ausgewiesen als vergleichbare konventionelle Betriebe (304 € ha^{-1}). Die Arbeitsentlohnung war mit 21.446 € AK^{-1} im Ökolandbau etwas höher als im konventionellen Landbau (20.180 € AK^{-1}).

3.1 Pflanzenbau

In einer deutschen Studie von Bockisch et al. (2000) werden die betriebsmittelbedingten Emissionen verschiedener konventioneller Bewirtschaftungsszenarien einem ökologischen gegenübergestellt und anhand von Emissionsfaktoren aus der Literatur Treibhausgasemissionen ermittelt (Tabelle 2). Bei den in der Studie bewerteten Verfahren der Pflanzenproduktion verursacht der ökologische Landbau

flächenbezogen durchweg deutlich geringere Treibhausgasemissionen als die konventionellen Systeme. Vorwiegend ist dieser Unterschied auf den Verzicht auf Mineraldünger im ökologischen Landbau zurückzuführen.

In einer britischen DEFRA-Studie (Williams et al., 2006) sind die CO_2 -Emissionen (Äquivalente) bei einer produktbezogenen Bilanz für eine ökologische Produktion teilweise

Tabelle 3:

Energieeinsatz und Beitrag zum Klimawandel bei ökologischer und konventioneller Produktion in Großbritannien (pro t Produkt-Einheit)

	Eingesetzte Primärenergie, in MJ t^{-1}	Treibhauseffekt, in CO_2 -Äquivalent t^{-1}
Weizen		
- konventionell	2.460	804
- ökologisch	1.740	786
Raps		
- konventionell	5.390	1.710
- ökologisch	4.020	1.620
Kartoffeln		
- konventionell	1.260	215
- ökologisch	1.280	199
Tomaten		
- konventionell	122	9,14
- ökologisch (heutiger Stand)	229	17,5
- ökologisch (intensiv)	159	12,2

Quelle: Williams et al., 2006.

Tabelle 2:

Betriebsmittelbedingte Emissionen bei Ökologischer im Vergleich zu konventioneller Pflanzenproduktion in (%) der konventionellen bzw. ressourcenschonenden Wirtschaftsweise (Zahlen unter 100 = ökologisch vorteilhaft)

		Ökologisch versus konventionell ^a	Ökologisch versus RS ^b
Primärenergieverbrauch			
Flächenbezogen	Nichtleguminosen	27 - 47	44 - 82
	Leguminosen	72 - 94	72 - 94
Produktbezogen	Nichtleguminosen	29 - 92	69 - 133
	Leguminosen	53 - 63	53 - 63
CO_2-Emissionen			
Flächenbezogen	Getreide, Futter	47 - 67	68 - 100
	Leguminosen	88 - 102	88 - 102
Produktbezogen	Getreide, Futter	74 - 127	100 - 164
	Leguminosen	54 - 63	54 - 63
CH_4-Emissionen			
Flächenbezogen	Nichtleguminosen	9 - 25	24 - 61
	Leguminosen	66 - 91	66 - 91
Produktbezogen	Nichtleguminosen	14 - 35	7 - 83
	Leguminosen	95 - 126	95 - 126
N_2O-Emissionen			
Flächenbezogen	Nichtleguminosen	1 - 4	1 - 12
	Leguminosen	74 - 88	74 - 88
Produktbezogen	Nichtleguminosen	1 - 69	3 - 150
	Leguminosen	45 - 60	45 - 60

^a Konventionelle Bewirtschaftung, mineraldüngerbasiert, keine Anrechnung des Wirtschaftsdüngers, vollständiger Kraftfutterzukauf, unterschiedliche Modelle für die Anrechnung des Primärenergieaufwandes für industrielle Mischfutterkomponenten;

^b RS = ressourcenschonend = konventionelle Bewirtschaftung, Anrechnung und Rückführung des Wirtschaftsdüngers und überwiegende Erzeugung eigenen Kraftfutters

Quelle: Bockisch et al., 2000.

Tabelle 4:

Klimarelevanz unterschiedlicher Produktionssysteme und Intensitäten in der Schweiz

Konventionell				Ohne Düngung	Ökologisch				
	K2	K1	M2	D0	D1	D2	O1	O2	
Produktionsmenge in kg TS ha ⁻¹	10.209	8.639	9.168	4.747	6.962	7.966	6.938	7.920	
in % von K2 (intensiv konventionell)	100 %	85 %	90 %	47 %	68 %	78 %	68 %	78 %	
kg N (total) ha ⁻¹ a ⁻¹	165	83	125	0	47	93	43	86	
Energiebedarf in GJ	- ha ⁻¹	21,0f	17,0e	26,9g	11,5a	12,6b	13,6c	13,2bc	14,5d
	- kg TS ⁻¹	2,0c	1,9bc	2,8e	2,3d	1,7ab	1,6a	1,8bc	1,8ab
Klimagasausstoss	kg CO ₂ -Ä. ha ⁻¹	4.474d	2.951c	4.121d	1.457a	2.150b	2.804c	2.222b	2.920c
	- kg TS ⁻¹	0,43d	0,34bc	0,44d	0,30a	0,30a	0,35bc	0,31ab	0,36bc
D0 = Biologisch-Dynamisch - ohne Düngung (0 %), D1 = Biologisch-Dynamisch - halbe Düngung (50 %), D2 = Biologisch-Dynamisch - Praxisübliche Düngung (100 %), O1 = organisch-biologisch - halbe Düngung (50 %), O2 = organisch-biologisch - praxisübliche Düngung (100 %), K1 = konventioneller Anbau - organisch-mineralische Düngung (halbe Düngung 50 %), K2 = konventioneller Anbau - organisch-mineralische Düngung (praxisüblich 100 %), M2 = mineralisch - praxisübliche Düngung (100 %). Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede. Quelle: Nach Nemecek et al., 2005.									

schlechter, teilweise besser als bei konventioneller mineraldüngerbasierter Produktion (Tabelle 3). Hier schneiden wenig entwickelte und energieaufwändige Ökolandbau-Systeme wie die Geflügelfleisch- und Eierproduktion sowie die Gewächshauskulturen (Tomaten) schlechter ab. Aber auch Milch hat einen vergleichsweise ungünstigen Wert.

Die DEFRA-Studie hat enge Systemgrenzen und betrachtet nicht die gesamte Produktionskette (funktionelle Einheiten: z.B. Fruchtfolge, Gesamtbetrieb). Eine methodisch korrektere Kalkulation hätte z.B. die Futterart, ihre Produktion und Herkunft, den Humusaufbau von Fruchtfolgegliedern (Klee gras als Ackerfutter versus Silomais) beachten müssen.

Praxisdaten mit unterschiedlichen Ausgangsdaten führen zu den verschiedenen Ergebnissen. Ökologisch ist eben nicht gleich ökologisch, genauso wenig wie konventionell gleich konventionell ist. Eine Studie aus der Schweiz (Nemecek et al., 2005) zeigt in Tabelle 4 am Beispiel des bislang am konsequentesten durchgeführten Langzeitversuchs unterschiedlicher Anbausysteme mit den verschiedenen Varianten des Ökolandbaus - dem DOK-Versuch in der Schweiz (Mäder et al., 2002) -, dass auch bei produktbezogener Betrachtung der Ökologische Landbau gegenüber der intensiven oder extensiven Landwirtschaft vorteilhaft oder vergleichbar ist.

In der gleichen Studie von Nemecek et al. (2005) wurden auch existierende Betriebe in der Schweiz untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass der integrierte Landbau in der Definition der Schweiz teilweise eine geringere Freisetzung von Treibhausgasen pro Produkteinheit aufweist als der Ökologische Landbau (nach Richtlinien der Schweiz) (Tabelle 5). Dieses zeigt, dass in der Praxis die Systemgrenzen sehr unterschiedlich sein können und Ergebnisse aus Anbauversuchen relativieren.

Fritsche & Eberle (2007) haben mit der Datenbank-

Tabelle 5:

Bewertung der Klimarelevanz verschiedener Kulturen bezogen auf die Fläche (kg CO₂-Äq. ha⁻¹ a⁻¹) bzw. auf die Produkteinheit (g CO₂-Äq. kg⁻¹ TS)

		Integrierte Produktion (IPintensiv) ¹	Biologischer Landbau
Winterweizen	Fläche	4.126	3.424
	Produkt	692	913
Wintergerste	Fläche	3.941	3.137
	Produkt	605	804
Winterroggen	Fläche	3.481	3.005
	Produkt	484	769
Kartoffeln	Fläche	5.428	3.852
	Produkt	653	764
Raps	Fläche	3.817	2.946
	Produkt	1.304	1.549
Ackerbohne	Fläche	3.217	3.929
	Produkt	978	1.335
Erbsen	Fläche	3.209	3.443
	Produkt	961	1.300

1: IPintensiv = integrierte Produktion - intensiv mit Pflanzenschutz.
Quelle: Nemecek et al., 2005.

Software GEMIS (Globales Emissions-Modell Integrierter Systeme) mit der Version 4.4 die Klimarelevanz von Lebensmitteln im Bedürfnisfeld Ernährung die Daten von Taylor (2000) neu kalkuliert. Sie umfassen den gesamten Bereich von der Produktion bis zur Theke. Die Daten zur landwirtschaftlichen Produktion basieren auf den Daten von der Landwirtschaftlichen Beratungszentrale Lindau in der Schweiz (LBL, 1998), da diese Daten zur konventionellen und ökologischen Produktion enthalten. Sie kommen zu dem Schluss, dass Produkte aus ökologischer Produktion weniger Treibhausgase freisetzen (Tabelle 6).

Tabelle 6:

Klimabilanz für pflanzliche Nahrungsmittel aus konventioneller und ökologischer Landwirtschaft beim Einkauf im Handel (g CO₂-Äquivalente kg⁻¹)

	Konventionell	Ökologisch
Gemüse-frisch	150	127
Gemüse-Konserven	509	477
Gemüse-TK ¹	412	375
Kartoffeln-frisch	197	136
Kartoffeln-trocken	3.768	3.346
Pommes-frites-TK	5.714	5.555
Tomaten-frisch	327	226
Brötchen, Weißbrot	655	547
Brot-misch	763	648
Feinbackwaren	931	831
Teigwaren	914	766

¹ Tiefkühlkost
Quelle: Fritsche & Eberle, 2007.

Hülsbergen und Küstermann (2007) untersuchten mit Hilfe des Programms REPRO 28 Betriebe in Süddeutschland (ökologisch n = 18, integriert n = 10) mit dem Ergebnis, dass das Treibhauspotenzial der ökologisch wirtschaftenden Betriebe mit 918 kg CO₂-Äquivalenten ha⁻¹ niedriger war als das der integriert bewirtschafteten mit 2.618 kg CO₂-Äquivalente ha⁻¹. Bezogen auf die produzierte Tonne fielen die Unterschiede zwar deutlich geringer aus, aber immer noch zu Gunsten der ökologisch wirtschaftenden Betriebe (274 kg CO₂ eq t⁻¹ vs 370 kg CO₂ eq t⁻¹). Ebenfalls konnten sie einen linearen Zusammenhang zwischen Energieinput und Treibhauspotenzial nachweisen, der vor

allem auf die steigenden N₂O- und CO₂-Emissionen durch den zunehmenden Mineral-N- und Energieinput bei konventioneller Bewirtschaftung zurückzuführen ist. Der Zusammenhang wird jedoch außerordentlich stark von den aus dem Humusaufbau bzw. -abbau abgeleiteten CO₂-Äquivalenten bestimmt. Würden diese unberücksichtigt bleiben, so würde - wie am Beispiel des Versuchsbetriebes Scheyern ausgeführt - das Treibhauspotenzial der ökologischen Fruchtfolge deutlich ansteigen, während dies für die integrierte Fruchtfolge verringert würde (Hülsbergen und Küstermann, 2007).

Bei der Bewertung von Grünland bzw. dessen Produkten, aber auch des Maisanbaus kommen die Studien zu einem verringertem Treibhauspotenzial zu Gunsten der ökologischen Bewirtschaftung sowohl in Bezug auf die Fläche als auch auf die Produkteinheit. Nemecek et al. (2005) kommen zu einer gleichen Einschätzung, unabhängig von der Intensitätsstufe, die sich in erster Linie auf die Anzahl der Nutzungen pro Jahr bei daran angepasster Düngungsintensität bezieht (Tabelle 7).

Entscheidenden Einfluss, vor allem auf die N₂O-Emissionen, hat die Düngung. Nachgewiesen wurde, dass diese bei mineralischer Düngung oftmals höher ist als bei organischer Düngung (Dittert et al., 2005; Lampe et al., 2006). Dies ist dadurch begründet, dass mineralisch gedüngter Stickstoff sofort für die Mikroorganismen verfügbar ist, während der verfügbare Anteil von Gülle-N nur bei ca. 50 % NH₄-N liegt.

Wagner-Riddle et al. (1997) ermittelten für eine Testfläche in Kanada deutlich erhöhte N₂O-Emissionsraten nach dem Umbruch von Luzerne. Dies deckt sich mit den Ergeb-

Tabelle 7:

Bewertung der Klimarelevanz verschiedener Kulturen bezogen auf die Fläche (kg CO₂-Äq. ha⁻¹ a⁻¹) bzw. auf die Produkteinheit (g CO₂-Äq. kg⁻¹ TS⁻¹)

	Bezugseinheit	Konventionell	IPint bzw. RS	Biologischer Landbau	Quelle
Grassilage	Fläche	2.130	1.040	631	Bockisch et al., 2000
	Produkt	243	119	91	Bockisch et al., 2000
		80		17	Taylor, 2000
Heu	Fläche	2.236	1.146	706	Bockisch et al., 2000
	Produkt	255	131	102	Bockisch et al., 2000
		106		48	Taylor, 2000
Weidegras	Fläche	1.943	853	486	Bockisch et al., 2000
		3.189	3.016	1.778	Nemecek et al., 2005 ¹
	Produkt	221	98	70	Bockisch et al., 2000
		38,6	36,5	32,3	Nemecek et al., 2005 ²
Maissilage	Fläche		4.247	3.108	Nemecek et al., 2005
		1.927	1.136	847	Bockisch et al., 2000
	Produkt		247	226	Nemecek et al., 2005
		147	87	87	Bockisch et al., 2000
		103			Taylor, 2000

¹ Varianten nach Nemecek et al., 2005: Konventionell: Gras_Int_T, Integriert: Gras_Int_T_50K, Bio: Gras_M.Int_T_Bio

² in CO₂-Äquivalente MJ NEL⁻¹

IPint = Integrierte Produktion mit intensiven Pflanzenschutz (vgl. Nemecek et al., 2005; RS = Ressourcenschonend = konventionelle Bewirtschaftung, Anrechnung und Rückführung des Wirtschaftsdüngers und überwiegende Erzeugung eigenen Kraftfutters (vgl. Bockisch et al., 2000)

nissen von Flessa et al. (2002), die ebenfalls für das Jahr nach dem Leguminosenumbruch auf verschiedenen Testflächen erhöhte N_2O -Emissionen (Tabelle 8) ermittelten. Direkte N_2O -Emissionen während der Wachstumsperioden der Leguminosen waren jedoch vergleichsweise gering.

Tabelle 8:

N-Emissionen aus unterschiedlichen Kulturen

Kultur	Düngegabe	N_2O -Emission (kg ha ⁻¹ a ⁻¹)
Lupine	ungedüngt	2,1 - 2,4
Sonnenblumen nach Leguminosenumbruch	50 kg als Festmist	9,4 - 12,9
Sonnenblumen mit Kleeuntersaat nach Leguminosenumbruch	ungedüngt	12,0
Weizen nach Leguminosenumbruch	ungedüngt	7,4
Weizen	190 kg Mineraldünger	9,6 - 5,8
Weizen	90 kg Mineraldünger	1,8 - 3,6

Quelle: Flessa et al. (2002).

N_2O - und CH_4 -Emissionen sind besonders hoch bei Beweidung. Dabei werden die CH_4 -Emissionen besonders durch die Kotflecken verursacht, die extrem hohen N_2O -Emissionen dagegen sind auf die Harnabgabe und die dadurch verursachten hot-spots zurückzuführen (Flessa et al., 1996; Anger et al., 2003). Die gesamten N_2O -Verluste belaufen sich auf 3,2 % des ausgeschiedenen Stickstoffs. Flessa et al. (1996) kommen zu dem Schluss, dass die von den Weidetieren abgegebenen Exkremente eine der wichtigsten Quellen der N_2O -Emissionen darstellen, wobei die Größenordnung bisher deutlich unterschätzt wurde.

3.2 Tierhaltung

Die für einen Systemvergleich zwischen ökologischer und konventioneller Milcherzeugung notwendigen Studien liegen bisher nur sehr begrenzt vor. Es gibt nur wenige Arbeiten, welche die gesamte Produktionskette inklusive der vor- und nachgelagerten Bereiche beleuchten.

Aus den Kalkulationen mit dem Datenbank-Modul GE-MIS, Version 4.4, (Fritsche & Eberle, 2007) wird ersichtlich, dass die Emission von klimarelevanten Gasen bei tierischen Produkten wesentlich höher als bei pflanzlichen Produkten ausfällt (Tabelle 9, Tabelle 6).

In der DEFRA-Studie (Williams et al., 2006) wird deutlich, wie wichtig die Definition der Systemgrenzen ist. So ist die Ökologische Fleischproduktion im Widerspruch zu vielen anderen Studien stärker klimarelevant als die konventionelle Produktion (bis auf Schweinefleisch) (Tabelle 10).

Wie wichtig die Betrachtungsebene ist, zeigt ein Vergleich der Ergebnisse aus der DEFRA-Studie mit weite-

Tabelle 9:

Klimabilanz für tierische Nahrungsmittel aus konventioneller und ökologischer Landwirtschaft beim Einkauf im Handel (g CO_2 -Äquivalente kg⁻¹)

	Konventionell	Ökologisch
Geflügel	3.491	3.033
Geflügel-TK	4.519	4.061
Rind	13.303	11.371
Rind-TK	14.331	12.398
Schwein	3.247	3.038
Schwein-TK	4.275	4.064
Butter	23.781	22.085
Joghurt	1.228	1.156
Käse	8.502	7.943
Milch	938	881
Quark, Frischquark	1.925	1.801
Sahne	7.622	7.098
Eier	1.928	1.539

Quelle: Fritsche & Eberle, 2007.

Tabelle 10:

Energieeinsatz und Beitrag zum Klimawandel bei ökologischer und konventioneller Produktion in Großbritannien bei reduzierter Systembetrachtung (pro t Produkt)

	Eingesetzte Primärenergie, in MJ t ⁻¹	Treibhauseffekt, in CO ₂ -Äquivalent t ⁻¹
Milch		
konventionell	25.200	10.600
ökologisch	15.600	12.300
Rindfleisch		
konventionell	27.800	15.800
ökologisch	18.100	18.200
Schweinefleisch		
konventionell	16.700	6.360
ökologisch	14.500	5.640
Schafffleisch		
konventionell	23.100	17.500
ökologisch	18.400	10.100
Geflügelfleisch		
konventionell	12.000	4.570
ökologisch	15.800	6.680
Eier		
konventionell (Käfig)	13.600	5.250
ökologisch	16.100	7.000

Quelle: Williams et al., (2006).

ren Studien zur Milchproduktion (Tabelle 11). Um die Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Angaben umgerechnet bzw. Teilbeträge herausgezogen. Da für Ammoniak (indirekt klimarelevant) kein Umrechnungsfaktor in CO_2 -Äquivalente gegeben ist, wurde hier auf die Darstellung verzichtet. Die Aussagen im Ergebnisteil beziehen sich immer auf die Produktmenge.

Tabelle 11:

Klimarelevanz der Milchproduktion - Ergebnisse aus verschiedenen Studien

Quelle	Bezugsgröße	Konventionell	Ökologisch	Verhältnis	Anmerkungen
Primärenergieaufwand:					
Abel zit. in Taylor, 2000	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	2.180	740	2,9 : 1	
Scheitz zit. in Taylor, 2000	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	3.360	1.640	2,0 : 1	nur Verarbeitung ohne Idw. Erzeugung
Bockisch et al., 2000	MJ Tier ⁻¹	18.675	8.113	2,3 : 1	Leistung 6.000 : 5.000 kg
	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	2.721	1.474	1,8 : 1	ohne Futterimporte
Haas et al., 20001	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	2.700	1.200	1,9 : 1	LCA-Methode, Allgäu, Grünland
Grönroos et al., 2006	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	6.390	4.410	1,4 : 1	incl. Verarbeitung, Finnland
Meul et al., 2007	MJ t ⁻¹ Milch ⁻¹	4.385	-		ohne Verarbeitung
		2.576			beste Betriebe
CO ₂ -Emissionen					
Bockisch et al., 2000	kg CO ₂ Tier ⁻¹	1.395	764	1,8 : 1	Leistung 6.000 : 5.000 kg
	kg CO ₂ t ⁻¹ Milch ⁻¹	203	140	1,4 : 1	ohne Futterimporte
Haas et al., 2001	kg CO ₂ t ⁻¹ Milch ⁻¹	177	88	2,0 : 1	LCA-Methode, Allgäu, Grünland
Weiske et al., 2006	kg CO ₂ t ⁻¹ Milch ⁻¹	129	83	1,6 : 1	Modell, 30 % RR
CH ₄					
Bockisch et al., 2000	kg CO ₂ e Tier ⁻¹	ohne Angabe	13,96		ohne biogene Quellen
	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	ohne Angabe	2,52		ohne biogene Quellen
Haas et al., 2001	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	706	846	1 : 1,20	LCA-Methode, Allgäu, Grünland
Weiske et al., 2006	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	516	635	1 : 1,23	Modell, 30 % RR
Sneath et al., 2006	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	9,6	8,1	1,18 : 1	nur Güllelagerung im Keller ohne Respiration
Hensen et al., 2006	kg CO ₂ e Tier ⁻¹ und Tag ⁻¹	16,1 (Gülle) 32,2 (Einstreu)			Farmemissionen: Respiration + Dunglager
N ₂ O					
Bockisch et al., 2000	kg CO ₂ e Tier ⁻¹	ohne Angabe	10,23		ohne biogene Quellen
	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	ohne Angabe	2,17		ohne biogene Quellen
Haas et al., 2001	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	417	365	1,14 : 1	LCA-Methode, Allgäu, Grünland
Weiske et al., 2006	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	645	676	1 : 1,05	Modell, 30 % RR
Summe in CO ₂ -Äquivalente					
Abel zit. in Taylor, 2000	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	611	538	1,13 : 1	
Scheitz zit. in Taylor, 2000	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	778	691	1,12 : 1	nur Verarbeitung ohne Idw. Erzeugung
Bockisch et al., 2000	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	keine Angaben	145		ohne biogene Quellen
	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	keine Angaben	27		aus Kraftfutter
Haas et al., 2001	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	1.300	1.299	1 : 1	LCA-Methode, Allgäu, Grünland
Casey & Holden, 2005	kg CO ₂ e t ⁻¹ Kraftfutter	1.156			Irland
	kg CO ₂ e t ⁻¹ ECM ⁻¹	1.500			
	kg CO ₂ e t ⁻¹ ECM ⁻¹	195			aus Kraftfutter (13 % Anteil)
Weiske et al., 2006	kg CO ₂ e t ⁻¹ Milch ⁻¹	1.290	1.394	1 : 1,08	Modell, 30 % RR

Folgende Schlussfolgerungen können zur Milchproduktion gezogen werden:

- Es gibt deutliche Unterschiede bei der Bewertung des Primärenergieeinsatzes: Die konventionelle Milcherzeugung verbraucht ca. das Anderthalbfache bis Doppelte an Energie verglichen mit der Öko-Milchviehhaltung. Hauptverursacher ist die Kraftfuttererzeugung bzw. der -einsatz je t Produkt.
- Hinsichtlich der Summe der Emission in kg CO₂-Äquivalenten je t Milch ergibt sich kein deutlicher Vorteil für eine der beiden Varianten.
- Die CO₂-Emissionen spiegeln die Ergebnisse des Primärenergieeinsatzes wider, hier hat der Ökolandbau aufgrund des bevorzugten Einsatzes hofeigenen Kraftfutters Vorteile.
- Die Methanemission je Produkteinheit ist im Ökolandbau höher, bedingt durch die geringere Milchleistung, den dadurch erhöhten Anteil des Erhaltungsbedarfs und den erhöhten Einsatz an Raufutter.
- Die Emissionen an Lachgas unterscheiden sich nicht bedeutsam.

4 Welche Rolle spielt die Tierernährung im Ausstoß von Treibhausgasen?

Wie wichtig die Systembetrachtung ist, zeigt das Beispiel der Tierernährung. Im Bereich der tierischen Erzeugung gilt die Milchviehhaltung als eine bedeutende Quelle von klimarelevanten Gasen. Neben der Freisetzung von CO₂ durch den Betriebsmitteleinsatz zur Erzeugung der Futtermittel und dem Betrieb der Tierhaltungsanlagen spielen die Abgabe von N₂O (Weidehaltung, Lagerung der Abprodukte) und NH₃ (Aufstallung, Lagerung und Ausbringung der Abprodukte) eine Rolle. Am meisten diskutiert wird jedoch die Methanfreisetzung durch den Verdauungsprozess der Wiederkäuer. Dieser ist mit 75 - 83 % an den gesamten CH₄-Emissionen - 84 bis 123 kg pro Kuh und Jahr - beteiligt (Monteny et al., 2006). Der Rest entfällt auf die Lagerung und Ausbringung der Exkremente.

4.1 Wiederkäuer

Das Verhältnis von Grundfutter zu Kraftfutter stellt einen wesentlichen Faktor der Methanogenese dar. Die bisher publizierten Ergebnisse zur Auswirkung des Grundfutter-Kraftfutter-Verhältnisses auf die tierbezogene Methanausscheidung sind widersprüchlich. So beschreiben Hindrichsen et al. (2006) eine höhere CH₄-Emission der Gruppe von Milchkühen, die zusätzlich Kraftfutter erhielten im Vergleich zu der Gruppe mit ausschließlicher Grundfutturaufnahme. Lovett et al. (2003) stellen fest, dass Rationen mit niedrigem Grundfutter-Kraftfutter-Verhältnis bei Mast-

bullen die CH₄-Emissionen reduzieren, wohingegen Boadi et al. (2004b) dabei eine 20%ig höhere CH₄-Emission feststellen. Die Faserverdaulichkeit (NDF und ADF) bei grundfutterorientierter Fütterung von Milchkühen ist höher als bei Zugabe von Kraftfutter (Hindrichsen et al., 2006), wodurch die Methanbildung ansteigt. Allgemein kann man sagen, dass die Kohlenhydrate die größte Rolle für die CH₄-Bildung beim Wiederkäuer spielen (Jentsch et al., 2007). Der Kohlenhydrattyp des Futters (Struktur-Kohlenhydrat oder Nicht-Struktur-Kohlenhydrat) ist entscheidend für die CH₄-Emission (Kebreab et al., 2006). Je mehr Struktur-Kohlenhydrate (Raufutter) vorhanden sind, umso größer ist die CH₄-Bildung. So führen stärkereiche Rationen (weniger Struktur) zu einer erhöhten Propionatbildung. Damit steht kein Wasserstoff für die Methanbildung zur Verfügung, die endogene Methanbildung ist damit verringert. Eine raufutterbasierte Ration fördert die Acetat- und damit die Methanbildung, da genügend Wasserstoff vorhanden ist. D.h. Struktur-Kohlenhydrate führen zu stärkerer Methanbildung als Nicht-Struktur-Kohlenhydrate.

Eine Vielzahl von Autoren verweisen deswegen für eine angestrebte Senkung der endogenen Methanausscheidungen auf verstärkte Kraftfutterfütterung. Die direkte tierbezogene CH₄-Emission kann sicherlich durch höhere Anteile an Kraftfutter gesenkt werden. Es wird aber ignoriert, dass dadurch eine verstärkte Methanogenese in der Gülle statt findet. Es kommt zu einer Verschiebung der Fermentation vom Pansen und Dünndarm in den Dickdarm und die Gülle (Veränderungen in der Mikrobenpopulation in den einzelnen Abschnitten des Verdauungstraktes).

Auch die Fütterung mit Maissilage beeinflusst die Methanbildung, einerseits wird die Methanogenese durch die höhere Passagerate im Verdauungstrakt herabgesetzt (Hindrichsen et al., 2006), andererseits gelangt dadurch mehr Faser in die Gülle und steht dort den Mikroben für die Fermentation zur Verfügung. Damit steigt die CH₄-Emission aus der Gülle. Von Hindrichsen et al. (2004) wird beschrieben, dass die Lignifizierung der Faser die CH₄-Bildung dadurch reduziert, dass die Nährstoffverfügbarkeit für die Mikroben eingeschränkt ist und somit die Methanogenese beeinträchtigt wird. Weiterhin fördert die Supplementierung mit höheren Nicht-Cellulose Polysacchariden (z. B. Guar Gum) die Propionat-bildenden Mikroben, wodurch wiederum Wasserstoff verbraucht wird und nicht für die Methanogenese zur Verfügung steht. Zucker fördern dagegen die Butyratproduktion auf Kosten der Propionatbildung und somit steht der Wasserstoff für die Methanogenese zur Verfügung (Hindrichsen et al., 2004), was in einer höheren Methanbildung resultiert.

Nicht nur das Grund- zu Kraftfutterverhältnis oder der Kohlenhydrattyp des Kraftfutters beeinflussen die Methanogenese im Tier bzw. in den tierischen Ausscheidungen, sondern auch die ruminale Verdaulichkeit (Hindrichsen et

al., 2006). So führt der Ersatz von Stärkequellen zu einer geringeren Verdaulichkeit (Maiskörner, native Maisstärke) durch gut-verdauliche Quellen (Maisflocken -dampfaufgeschlossen, Gerste) zu einer Erhöhung der Methanogenese im Tier.

Nicht vergessen werden darf z.B. die Freisetzung klimarelevanter Gase bei der Herstellung der Kraftfutterkomponenten, die bisher in keiner Studie zur Wirkung der Fütterung auf den Klimawandel bewertet werden (Boadi et al., 2004a).

Das Weidemanagement kann auch zur Senkung der Methanemissionen beitragen. So führt das Weiden von Mastbullen auf hoch-qualitativen Weiden (intensive Produktionssysteme) zur Reduktion der Methanogenese um bis zu 22 % (DeRamus et al., 2003).

4.2 Monogastrier

Die vorliegende Literatur zum Beitrag der Monogastrier an der Klimagasbildung ist deutlich geringer, da ihr Anteil auf lediglich 10 % an der CH_4 -Bildung geschätzt wird (Kebreab et al., 2006). Die Methan-Bildung findet vornehmlich im Colon statt und hängt stark von der Aufnahme an NSP (non-starch polysaccharides) ab. So ist die CH_4 -Bildung bei höherer NSP-Aufnahme erhöht. Rationen mit einem hohem NDF-Gehalt (Rübenschnitzel) führen beispielsweise zu einer höheren CH_4 -Bildung als Rationen mit geringeren NDF-Gehalten (z.B. Weizen) (Galassi et al., 2004).

Die Zusammensetzung und die Menge an fermentierbarer Faser beeinflusst die Mikrobienzusammensetzung und damit das Muster an flüchtigen Fettsäuren im Dickdarm, welches wiederum für die CH_4 -Bildung entscheidend ist. Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der CH_4 -Bildung und dem Anteil fermentierbarer Faser. Mit steigendem Anteil fermentierbarer Faser steigt die CH_4 -Bildung. Beim Monogastrier ist die Proteinzufuhr ein weiterer wichtiger Punkt bei Betrachtung der Klimarelevanz, wobei hier Stickstoff die größte Rolle spielt. So führt eine um 20 % geringere Proteinzufuhr zu einer Reduzierung von 30 % der N-Exkretion.

Es existieren verschiedene Modelle zur Kalkulation des Einflusses der Fütterung, der Futterart etc., bisher aber kein einheitliches Bewertungssystem (Ellis et al., 2007; Jentsch et al., 2007) an dem systemübergreifend gearbeitet werden muss.

5 Wo und wie können die Treibhausgas-Emissionen reduziert werden?

Gegenwärtig werden statistisch in Deutschland pro Einwohner und Jahr ca. 1,6 Tonnen CO_2 -Äquivalente durch Lebensmittelproduktion und -konsum (Bedürfnisfeld Ernährung für das Konsumjahr 2000) freigesetzt (Wieg-

mann et al., 2005; ÖKO, 2007). Bei einer Umstellung der Ernährung auf Lebensmittel aus regionaler, saisonaler und ökologischer Produktion sowie mit weniger Fleisch kann die Pro-Kopf-Emission in Deutschland bereits erheblich reduziert werden. Dieses reicht sicher nicht aus, wäre aber ein wichtiger Beitrag.

Durch die Umstellung von 20 % der landwirtschaftlichen Nutzfläche inkl. Tierhaltung auf den Ökologischen Landbau hat Offermann (2003) für die EU eine Reduktion von 3 % Treibhausgasen (CO_2 -Äquivalente) errechnet (-2 % CH_4 , -12 % CO_2 , -15 % N_2O). Diese Kalkulationen beruhen aber auf unsicheren Daten und sind deswegen mit Vorsicht zu interpretieren.

Dass sich Ertragssteigerungen bei angemessener Steigerung der Mechanisierung positiv auf eine Reduzierung des Treibhauspotenzials (pro Produktionseinheit) auswirken, zeigen die Ergebnisse der Monte-Carlo-Simulation von Nemecek et al. (2005). Sie kommen auf Korrelationskoeffizienten von -0,72 beim Ertrag und 0,11 bei der Mechanisierung. Somit sollte auch der Ökologische Landbau ein klares Bekenntnis zur Leistungssteigerung abgeben.

Bei zunehmender Flächenkonkurrenz wird Grünland umgebrochen und als Ackerland genutzt (z.B. zur Biomassenutzung von Mais oder Raps). Hierdurch wird CO_2 freigesetzt (Hoffmann et al., 2001). Seit der Wende 1990 hat die Dauergrünlandfläche um 736.000 ha abgenommen, im letzten Jahr (2006) nochmals um 47.300 ha (BMELV, 2007).

Während es im integrierten Anbau weiterhin eine Input-orientierte Optimierung geben muss, um die Öko-Effizienzen zu verbessern, muss der Ökologische Landbau dagegen eine Output-Optimierung durch ein höheres Ertragsniveau anstreben, vor allem in den Getreidekulturen und Kartoffeln. Das heißt Optimierung von Nährstoff-Management, Stärkung der Konkurrenzkraft der Kulturpflanzen und bessere Sortenwahl. Nemecek et al. (2005) schlagen für alle Landbausysteme für den Ackerbau und die Grünlandnutzung zahlreiche weitere Einzelmaßnahmen vor:

- besseren Maschinenausnutzung,
- Einsatz von reduzierten Bodenbearbeitungsverfahren,
- emissionsmindernde Maßnahmen bei der Düngerausbringung oder
- verbesserter Pflanzenschutz durch Prognosesysteme, Reduzierung der Wirkstoffmengen und resistente Sorten etc..

5.1 Potential der Bindung von CO_2 in Böden durch Humusaufbau

Ein wichtiger Faktor der betrieblichen Beeinflussung der Treibhausbelastung stellt die Humuswirtschaft dar (Mäder

et al., 2002; Capriel P., 2006; Hoyer et al., 2007). Die rechtlichen Vorgaben im Rahmen des Cross Compliance reichen hier nicht aus.¹ Hier hat der ökologische Landbau systemimmanente Vorteile, z.B. in der Fruchtfolge mit Humus aufbauenden Kulturen (Wetterich & Haas, 2000; Stolze et al., 2000; Haas et al., 2001).

Der Gehalt an organischem C (C_{org})² im Boden ist durch seine Bewirtschaftung determiniert (Penman et al., 2003). Mit Hilfe der Humusbilanz wird überprüft, ob zwischen den humusaufbauenden und humusabbauenden Prozessen in Ackerböden ein Fließgleichgewicht besteht. Eine ausgeglichene Humusbilanz (Saldo ca. ± 0 ; Versorgungsgrad des Bodens mit organischer Primärschubstanz ca. 100 %) lässt auf eine Erhaltung des Humusvorrates im Sinne einer nachhaltigen Produktion schließen. Angestrebt wird ein Fließgleichgewicht von Mineralisation und Humifizierung im Bereich des standort- und bewirtschaftungsspezifischen Optimalgehaltes des Bodens an Humus (Leithold, 2003).

Die heute formulierten standortbedingten Maximalgehalte an Humus im Boden, bei deren Überschreiten es zu unkontrollierten Stickstoffverlusten aus dem Boden kommt, gelten nicht für den Ökologischen Landbau. Hier werden eigene Grenzwerte und eine Anpassung der Humusproduktionsfaktoren gefordert (Körschens et al., 2005; Leithold und Brock, 2006). Nach Leithold (2003) beobachteten Versuchsansteller, dass die Beziehung zwischen Humusgehalt und Ertrag umso enger ist, je weniger Mineraldüngerstickstoff zum Einsatz kam. Daraus wurde geschlossen, dass unter Bedingungen des Ökologischen Landbaus ein höherer Humusvorrat gegenüber konventionell bewirtschafteten Böden möglich und erstrebenswert ist. Ein höherer Humusgehalt im Vergleich zur konventionellen Bodennutzung erlaubt die Realisierung höherer Grunderträge (Bodenleistung) und kompensiert so teilweise Ertragsverluste infolge Nichtanwendung von Mineraldüngerstickstoff. Zahlreiche Studien geben Beispiele für eine erfolgreiche Humusanreicherung in Böden unter ökologischer gegenüber konventioneller Bewirtschaftung (Fließbach et al., 2006; Munro et al., 2002). Feldstudien zum Vergleich praktischer Betriebe zeigen aber oft keine systematischen Unterschiede auf (Capriel, 2006; Hoyer et al., 2007).

Die Schwierigkeiten, Unterschiede der Humusgehalte in ökologischen gegenüber konventionell genutzten Ackerböden systematisch nachzuweisen, liegen darin, dass der Humusgehalt von systemübergreifenden Faktoren beeinflusst wird. Dazu zählen Fruchtfolgegestaltung, das Ma-

nagement der organischen Rückstände des Ackerbaus und die Bodenbearbeitung. In Source/Sink-Szenarien kann anhand des Auf- oder Abbaus der C_{org} -Gehalte in Böden direkt auf die klimarelevante CO_2 -Bilanz der Böden bei unterschiedlicher Bewirtschaftung geschlossen werden (Post, 2006).

Nach den IPCC-Richtlinien zur Kalkulation der Effekte der Landbewirtschaftung auf die C_{org} Gehalte von Böden verschiedener Klimaregionen (Penman et al., 2003) kann der Auf- oder Abbau von C_{org} in Ackerböden bei unterschiedlicher Landbewirtschaftung abgeschätzt werden. Als Einflussfaktoren werden die Bodenbearbeitung und das Reststoffmanagement von Ernterückständen auf den Flächen genutzt. Die Faktoren zeigen, dass geringe Bodenbearbeitungsintensität und hoher Input an organischen Rückständen den C_{org} -Gehalt des Bodens deutlich fördern (Tabelle 12).

Tabelle 12:

Faktoren zur Kalkulation der Entwicklung des C_{org} -Pools im Boden

Referenzwerte [t ha ⁻¹ C]	95 HAC ¹ Böden 71 Sandböden
Faktoren	
Landnutzung	0,71 > 20 Jahre Ackernutzung
Bodenbearbeitung	1,0 wendend, < 30 % Reststoffbedeckung zur Saat
	1,09 flach lockernd, > 30 % Reststoffbedeckung zur Saat
	1,16 Mulchsaat
Reststoffmanagement	0,9 geringe Rückfuhr
	1,0 mittel, alle Ernterückstände zurück
	1,11 Input hoch, ohne Wirtschaftsdünger, mit Zwischenfrüchten Grünbrachen
	1,38 Input hoch, mit Wirtschaftsdünger, mit Zwischenfrüchten, mit Grünbrachen
1 high activity clay Quelle: Penman et al. (2003).	

In ökologisch wirtschaftenden Betrieben wird in der Regel eine wendende Bodenbearbeitung durchgeführt (Rahmann et al., 2004). Dies ist ähnlich wie bei der überwiegenden Anzahl konventioneller Betriebe. Ebenso ist der Faktor Landnutzung in beiden Systemen gleich. Beim Reststoffmanagement gibt es jedoch deutliche systembedingte Unterschiede zwischen den Landbauformen. Ökologische Betriebe weisen hier durch den typischen Leguminosenbau, die Grünbrache, den Zwischenfruchtanbau und die Etablierung von Untersaaten bessere Voraussetzungen zur Humusanreicherung in Böden auf als konventionelle Betriebe, die nicht auf Gründungsmaßnahmen angewiesen sind.

In Abbildung 1 ist der Beitrag des unterschiedlichen Reststoffmanagements zur C-Bilanz von Böden dargestellt. Ein C_{org} -Vorrat im Boden von 67 t ha⁻¹ entspricht dabei ei-

¹ Zum Beispiel die Vermeidung von Humusabbau: Konsequenzen gibt es erst, wenn die betriebliche Humusbilanz im Durchschnitt von 3 Jahren einen Wert von -75 kg ha⁻¹ a⁻¹ überschreitet.

² Humusgehalte von Böden bzw. die Gehalte an organischer Substanz werden per Division durch 1,724 in C_{org} umgerechnet (Benzler et al., 1982). Der stöchiometrische Umrechnungsfaktor von C zu CO_2 ist 44/12.

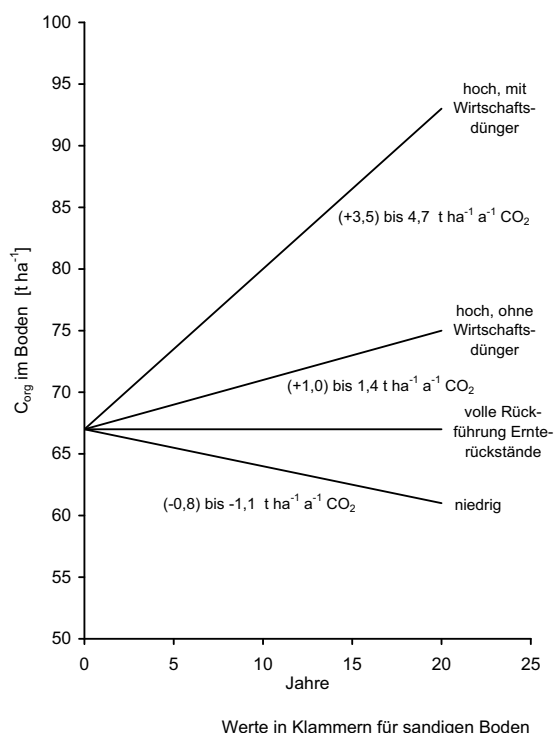


Abbildung 1:

Aufbau von organischer Bodensubstanz und CO₂-Bindung in Böden gemäß feuchter Klimate in 20 Jahren durch unterschiedliches Reststoffmanagement kalkuliert nach IPCC Good Practice Guidance for LULUCF (Penman et al., 2003)

nem C_{org}-Gehalt im Boden von ca. 1,6 % (30 cm Schicht, Bodendichte 1,4 g cm⁻³).

Der C_{org}-Gehalt der Böden steigt bei den Bewirtschaftungsvarianten mit intensiver Zufuhr von Ernterückstän-

den und Gründung je nach Bewirtschaftungsvariante in 20 Jahren gegenüber der mittleren Variante um 8 - 26 t ha⁻¹ an. Das bedeutet eine jährliche CO₂-Bindung von 1,4 - 3,7 t ha⁻¹. Auf sandigen Böden steigt der C_{org}-Gehalt der Flächen bei diesen Varianten im Kalkulationszeitraum von 20 Jahren um 6 bis 20 t, gegenüber der Variante mit mittlerer Rückfuhr der Reststoffe an. Es würden auf diesen Ackerflächen 1 bis 3,5 t ha⁻¹a⁻¹ CO₂ mehr gebunden werden. Bei der Variante mit geringer Rückfuhr von Ernterückständen kommt es zu Humusabbau und zu CO₂-Verlusten aus der Fläche.

In Dauerfeldversuchen in Bad Lauchstädt und Müncheberg wurden in 51 Jahren der C_{org}-Gehalt des Bodens (0 - 20 cm) um ca. 0,15 % bzw. 0,2 % angehoben (Post, 2006). Küstermann et al., 2007 fanden in Systemvergleichen, dass ökologische Betriebe im Mittel jährlich 402 kg CO₂ ha⁻¹ im Humus speichern (Spannweite: -1.830 bis +489, Tabelle 13). Nach den Autoren stellt die Humusanreicherung im Boden den maßgeblichen Grund für die flächenbezogene Nettoentlastung der Atmosphäre mit Treibhausgasen bei ökologischer Bewirtschaftung gegenüber konventionellen Vergleichssystemen dar.

Die Änderung der C-Gehalte im Boden muss jedoch temporär betrachtet werden, bis sich ein standort- und bewirtschaftungstypisches neues Humusniveau ausgebildet hat. Der Zeitraum für die Herausbildung eines neuen Equilibriums liegt unter mitteleuropäischen Bedingungen bei 100 Jahren. Landbewirtschaftungssysteme werden daher nicht als dauerhafte CO₂-Senke sondern als temporärer Entlastungsmechanismus auf dem Weg zu einer dauerhaften Nettoentlastung der Atmosphäre angesehen werden (Smith, 2005).

Tabelle 13:

Kennzahlen zum Stoff- und Energiehaushalt, zur C Sequestrierung und Treibhausgasemissionen im Pflanzenbau der Untersuchungsbetriebe

Parameter	ME	Ökologische Betriebe (n = 18)			Integrierte Betriebe (n = 10)		
		Scheyern	Mittel	(Min - Max)	Scheyern	Mittel	(Min - Max)
Energie-Input	GJ ha ⁻¹	5,9	5,4	(4,1 - 7,8)	14,0	11,9	(9,5 - 15,0)
N-Input	kg N ha ⁻¹	185	149	(108 - 227)	275	240	(193 - 304)
TM-Ertrag	t ha ⁻¹	6,5	3,6	(2,0 - 7,7)	14,5	7,5	(4,5 - 9,0)
Output/Input-Verhältnis		18,0	12,4	(6,0 - 19,3)	11,1	11,9	(6,1 - 16,2)
Treibhauspotential							
CO ₂ -Emission (Energie-Input)	kg CO ₂ eq ha ⁻¹	504	451	(320 - 750)	1.220	1.018	(819 - 1.215)
C-Speicherung im Humus*	kg CO ₂ eq ha ⁻¹	-1.350	-402	(-1830 - 489)	910	202	(-659 - 638)
N ₂ O-Emissionen	kg CO ₂ eq ha ⁻¹	1.227	869	(631 - 1322)	1.317	1.398	(1.123 - 1.771)
Treibhauspotential	kg CO ₂ eq ha ⁻¹	323	918	(106 - 1875)	3.697	2.618	(1.878 - 3.112)
Treibhauspotential	kg CO ₂ eq t ⁻¹	50	274	(23 - 431)	255	370	(271 - 388)

* Positive Werte bedeuten einen Humusabbau und die Abgabe von im Boden gebundenem C an die Atmosphäre, negative Werte einen Humusaufbau und die Rückbindung von C aus der Atmosphäre in den Boden.
Quelle: Nach Küstermann et al., (2007).

Nach Rühling et al. (2005) änderte sich der C_{org} -Gehalt der Böden des Dauerfeldversuches auf dem Versuchsgut Scheyern im Verlaufe 10-jähriger Bewirtschaftung um $+0,18 \text{ t C ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ($-0,66 \text{ t CO}_2 \text{ a}^{-1}$) bei ökologischer Bewirtschaftung; $n = 106$) gegenüber $-0,12 \text{ t C ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ($+0,44 \text{ t CO}_2 \text{ a}^{-1}$) bei integrierter Bewirtschaftung; $n = 116$). Smith (2005) gibt das Potential des Ökologischen Landbaus zur Kohlenstoff-Sequestrierung mit $0 - 0,54 \text{ t ha}^{-1} \text{ a}^{-1} \text{ C}$ (0 bis $-1,98 \text{ t a}^{-1} \text{ CO}_2$). Die Werte für den Ökologischen Landbau liegen damit im Bereich der in Abbildung 1 genannten Steigerungsraten zwischen den Systemen mit mittlerem und hohem Input organischer Reststoffe auf die Flächen. Diese Abschätzungen und Messungen werden durch eine rein stöchiometrische Berechnung der CO_2 -Bindung von Böden durch langfristigen Humusaufbau anhand der C_{org} -Gehalte von Böden bestätigt. Pro 1/10 Promille Steigerung des C_{org} -Gehaltes im Boden ergibt sich hier eine CO_2 -Bindung von ca. $1,4 - 1,7 \text{ t ha}^{-1}$. Diese Bandbreite gilt für mittlere Lagerungsdichten der Bodenschicht von $0 - 30 \text{ cm}$ zwischen $1,3 - 1,5 \text{ g cm}^{-3}$ (Abbildung 2).

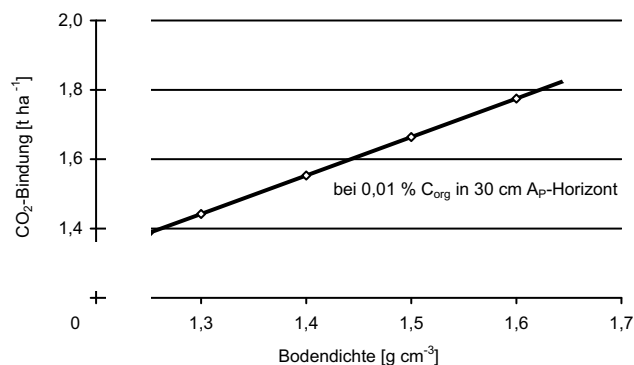


Abbildung 2:
Stöchiometrische Berechnung der CO_2 -Bindung von 0,01% C_{org} im Boden bei verschiedenen Bodendichten

Eine systematische Steigerung der C_{org} -Gehalte von ökologisch bewirtschafteten Böden in der Größenordnung von 0,01 bis 0,1 % gegenüber konventionell bewirtschafteten Flächen mit mittlerer Rückführung organischer Substanz erscheint aufgrund der genannten Quellen realistisch. Die Umstellung konventioneller Betriebe auf Ökologischen Landbau würde, konservativ abgeschätzt, mit 50 % der CO_2 -Bindung durch Humusaufbau aus Abbildung 2, in einem Planungszeitraum von 10 - 20 Jahren zu einer zusätzlichen CO_2 -Bindung von 7 bis 17 t ha^{-1} führen.

5.2 Tierhaltung

Es liegen einige Untersuchungen zur Reduzierung der Emissionen bei der Dunglagerung und -ausbringung vor (z.B. Casey et al., 2005; Monteny et al., 2006; Sneath et

al., 2006; Weiske et al., 2006; Hüther, 1999), die sowohl in der konventionellen als auch der ökologischen Milchviehhaltung Anwendung finden können. Weidehaltung per se muss nicht zu erhöhten Emissionen führen, wenn eine höhere Verdaulichkeit des Futters gegeben ist und durch eine verbesserte Tiergesundheit die Remontierungsrate gesenkt werden kann. Dies gilt auch für die Bereitstellung von Ausläufen.

Die erhöhten Methanemissionen je Produkteinheit sind der kritische Punkt bei der Ökologischen Milchviehhaltung - hier sollten Verbesserungen zuerst ansetzen. Dieses wären vor allem die verbesserte Futtergrundlage, Leistungssteigerungen auf ein zu definierendes Optimum, das beste Tiergesundheit sichert und die Remontierungsrate reduziert. Auch Optimierungen in der Gestaltung der Haltungsumwelt können helfen, um Produktionskrankheiten und damit vorzeitige Abgänge zu vermeiden (Sundrum, 2002).

Die Tierernährung hat Einfluss auf die Ausscheidungen von CO_2 , CH_4 , N_2O , NH_4 , P und K. Daraus ergeben sich Interventionsmöglichkeiten, um die Umweltschäden zu reduzieren. Eine Optimierung ist möglich über (Tamminga, 2003):

- Senkung der Tierzahl, gleichzeitige Erhöhung der Langlebigkeit (insbesondere bei Milchkühen) bzw. Erhöhung der Wurfgößen bei Sauen, Verringerung der Mortalität und Erhöhung der Produktivität,
- Verbesserung der Verwertung, dies trifft im Besonderen auf die Proteinverwertung bei Monogastrier zu, z.B. über Phasenfütterung, verbesserte Proteinqualität durch Auswahl einer optimalen Kombination von Futterkomponenten für Schwein und Geflügel,
- Einsatz stärkereicherer Rationen bei Wiederkäuern, um die Bildung von Propionsäure zu fördern oder Zusatz von Fett, der ebenso die Methan- Bildung im Gastro-Intestinal-Trakt senkt.

Im Ökologischen Landbau wird eine größtmögliche Rückführung von organischen Stoffen und Nährstoffen innerhalb des Systems Boden-Pflanze-Tier angestrebt. Die Anzahl der gehaltenen Tiere ist auf ein Maß begrenzt, bei dem die Versorgung der Tiere durch im Betrieb erzeugte Futtermittel möglich ist. Aus diesem Grund ist im Ökologischen Landbau der Tierbesatz pro Flächeneinheit in der Regel geringer als in konventionell bewirtschafteten Viehbetrieben. Im Zuge der MIDAIR-Studie der Europäischen Union (2001) wurden Betriebsdaten von 15 konventionellen und ökologischen Betrieben in mehreren europäischen Staaten analysiert und miteinander verglichen. Der generell geringere Tierbesatz in den Ökobetrieben geht mit geringeren N-Überschüssen einher (Abbildung 3). Zwischen den N-Überschüssen und der Menge an emittierten Treib-

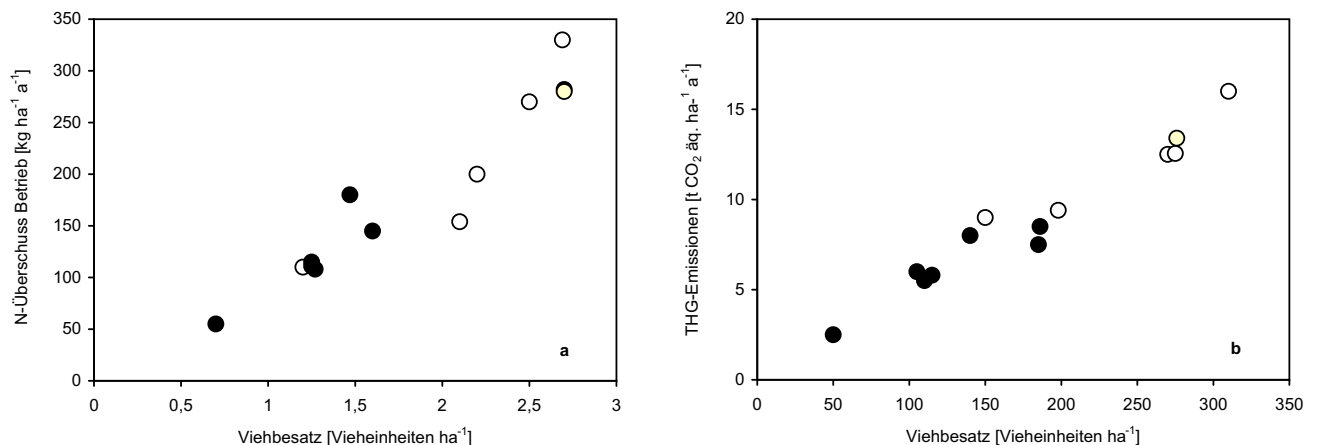


Abbildung 3:

N-Überschüsse in Abhängigkeit vom Tierbesatz (a) und Treibhausgasemissionen in Abhängigkeit vom N-Überschuss (b) in ökologischen und konventionellen Milchviehbetrieben (MIDAIR, 2001). Ausgefüllte Kreise: ökologische Betriebe

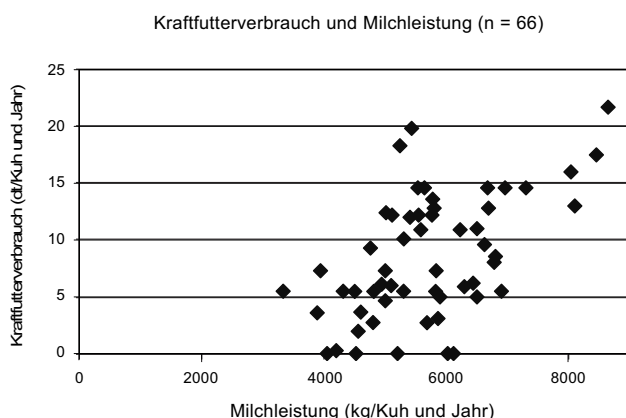
hausgasen besteht eine enge Korrelation. Bei Umstellung von konventioneller zu ökologischer Bearbeitung ist daher mit einem deutlichen Rückgang der Lachgas- und Methanemissionen pro ha Betriebsfläche zu rechnen.

Die Klimawirkung der Ökologischen Milchproduktion ist nicht befriedigend. In einer Studie von Rahmann et al. (2004) wurde festgestellt, dass es erhebliche Leistungsunterschiede bei sehr unterschiedlichem Kraftfuttereinsatz gibt (Abbildung 4). Es gibt Betriebe, die gar kein Kraftfutter füttern und trotzdem über 6.000 kg Milch pro Jahr und Kuh produzieren.

Auf die Milchmenge bezogen (vgl. Tabelle 10) können bei optimierter Bilanzierung oder bei Einführung eigener Kraftfuttererzeugung und bei Anrechnung und Nutzung des Wirtschaftsdüngers in der konventionellen Milchpro-

duktion günstigere Werte für die CO₂-Emission erreicht werden. Jedoch bleiben die produktgebundenen CH₄- und N₂O-Emissionen der ökologischen Milchviehhaltung deutlich unter denen der konventionellen Systeme. In der Schweineproduktion werden durch die Verwendung von betriebseigenem Kraftfutter sowie durch den Ersatz von Mineraldünger, durch Anrechnung und Rückführung von Wirtschaftsdünger bzw. durch unterschiedliche Ansätze zur Berechnung der Emissionsfaktoren für die verwendeten Kraftfutterkomponenten niedrigere tier- und produktgebundene CO₂-Emissionen in den entsprechenden konventionellen Verfahren erreicht. Verglichen mit rein mineraldüngerbasierten Systemen mit Kraftfutterzukauf, weist die ökologische Schweinemast tier- und produktbezogen hinsichtlich der CO₂-Emissionen deutlich günstigere Werte auf. Die Ergebnisse zeigen, dass die auf das Tier oder das tierische Produkt bezogene Energie- und CO₂-Bilanz im konventionellen Landbau maßgeblich durch die hofeigene Kraftfuttererzeugung und den Ersatz von Mineraldünger durch Wirtschaftsdünger verbessert werden kann. Eine konsequente Umsetzung der Maßnahmen im konventionellen Landbau birgt daher großes Potential zur Einsparung von Treibhausgasemissionen.

Ein großer Teil des in der Landwirtschaft emittierten Methans entstammt der Lagerung von Wirtschaftsdünger. Da im Ökologischen Landbau Haltungssysteme vorgeschrieben sind, bei denen höchstens 50 % des Stalles mit Spaltenböden ausgestattet sein dürfen und außerdem Liegebereiche mit ausreichender Einstreu vorhanden sein müssen, ist bei Umstellung mit einem Rückgang der Gülleproduktion und einem erhöhten Anfall an Festmist zu rechnen. Tendenziell ist dadurch nach den Ergebnissen von Hüther (1999) mit erhöhten Ammoniak- und Lachgasemissionen und geringeren Methanemissionen zu rechnen.



Quelle: Rahmann et al. (2004).

Abbildung 4:

Milchleistung und Kraftfutterverbrauch auf zufällig ausgewählten Ökologischen Milchviehbetrieben im Milchjahr 2002/03

Die Behauptung aus der klassischen Tierernährung, dass Kühe mit niedriger Leistung mehr klimarelevantes Gas pro kg Milch ausstoßen, ist sicherlich korrekt. Dabei ist aber die unterschiedliche Klimarelevanz der eingesetzten Futtermittel nicht beachtet. Die geringeren Milchleistungen im Ökologischen Landbau sind vor allem durch den erhöhten Raufuttereinsatz verursacht.³ Das in der Regel betriebseigen produzierte Raufutter hat eine wesentlich niedrigere Klimarelevanz als zum Beispiel Soja-Extraktionsschrot, besonders wenn es z.B. von gerodeten Regenwaldflächen aus Brasilien stammt. Deutschland importiert jährlich rund 6,8 Millionen Tonnen Futtermittel, davon rund die Hälfte aus Übersee, vor allem aus Brasilien und Argentinien. Die dafür benötigte Fläche umfasst rund 2,5 Millionen Hektar, was fast 25 % der deutschen Ackerfläche entspricht.

Die Verminderung von N-Bilanzüberschüssen und eine damit verbundene Absenkung der Treibhausgasemissionen bei konventioneller Schweinehaltung ist durch Zusammenarbeit von viehhaltenden und viehlosen Betreibern zu erreichen, wenn Mineraldünger durch Wirtschaftsdünger substituiert wird (Granstedt, 2000). Im Gegensatz dazu könnten in der ökologischen Schweinemast in einer Region durch verbesserte Zusammenarbeit von Betrieben bei der Futterproduktion gleiche Fleischmengen wie in konventioneller Erzeugung bei geringeren Flächen-N-Bilanz-Überschüssen und damit auch geringeren Treibhausgasemissionen produziert werden, dies allerdings auf Kosten der Produktion pflanzlicher Verkaufsprodukte (Sundrum, 2002).

In der konventionellen Tierhaltung wird durch den Einsatz von synthetischen Aminosäuren und Enzymen die Futter- und Nährstoffverwertung verbessert. Dadurch kann eine Verringerung des Gülleanfalls und damit auch des Nährstoffaustrags erreicht werden. Die Tatsache, dass in der ökologischen Tierhaltung auf den Einsatz synthetischer Aminosäuren verzichtet wird, kann somit zu erhöhten Nährstoffgehalten im Dünger und dementsprechend zu gesteigertem Emissionspotential aus dem Wirtschaftsdünger führen. Es ist bei der umweltspezifischen Bewertung jedoch zu berücksichtigen, dass N aus Wirtschaftsdüngern im Ökologischen Landbau die maßgebliche Quelle für die Nährstoffversorgung der Ackerpflanzen darstellt und daher eine N-Reduktion in der Gülle nicht unbedingt anzustreben ist. Wegen der Defizite an essentiellen Aminosäuren bei 100 % Biofutter sollte in der Pflanzenzucht jedoch auf eine Verbesserung der Gehalte an essentiellen Aminosäuren heimischer Kulturarten hingearbeitet werden.

5.3 Energie

Im Ökologischen Landbau ist die Erzeugung regenerativer Energie grundsätzlich mit anderen Ökobilanzen ausgestattet als bei konventioneller Erzeugung, da mit weniger energetischen Input in der Erzeugungskette und mit geringeren Flächenerträgen gearbeitet wird (ADAS, 2000).

Aufgrund des Verzichts auf chemisch-synthetische Mineraldünger und nahezu alle Pestizide ist der energetische Aufwand pro Flächeneinheit sowie das Treibhausgaspotential der ökologischen pflanzlichen Erzeugung gegenüber dem konventionellen Landbau deutlich gemindert. Pro kg erzeugtes Produkt trifft dies in der Regel auch für den Energieaufwand zu. Das produktbezogene Treibhausgaspotential ökologischer Produkte kann jedoch je nach Flächenertrag und Management gegenüber der konventionellen Erzeugung vermindert, ähnlich oder erhöht sein (Hülsbergen & Küstermann, 2007). Da der Flächenertrag überwiegend durch das Management und die Witterung beeinflusst wird, kann hier keine pauschale Aussage über die Vorzüglichkeit des einen oder anderen Anbausystems getroffen werden.

Geht man von ähnlichem produktbezogenen Treibhausgas-(THG)-potential aus wie im konventionellen Landbau, gelten für die Erzeugung von Bioenergie aus ökologisch erzeugter Biomasse die gleichen Energie- und Gasbilanzen wie im konventionellen Landbau. Jedoch gibt es produktionsspezifische Besonderheiten, die eine Erzeugung regenerativer Energie aus Biomasse hinsichtlich der THG-Bilanz des Ökologischen Landbaus besonders attraktiv machen.

Im Folgenden sind typische Effekte auf die THG-Bilanzen bei der Nutzung von Biomasse als regenerative Energiequelle dargestellt und die Besonderheiten des Ökologischen Landbaus hervorgehoben.

5.3.1 Biomasse für die Biogasgewinnung

Bei der Biogaserzeugung werden die THG-Emissionen durch Errichtung und Betrieb der Biogasanlage, Methanemissionen aus der Anlage, sowie die Bereitstellung der Substrate bedingt. Die THG-Emissionen pro erzeugte Energieeinheit liegen dann unter der Erzeugung in Kraftwerken mit fossilen Brennstoffen. Je nach Ausnutzung der Wärme kann die Treibhausgasbilanz gegenüber der Strom- und Wärmemixerzeugung in Kraftwerken noch verbessert werden. Ein wichtiger Punkt zur Verminderung von THG-Emissionen bei der Einführung von Biogasanlagen in viehhaltenden Betrieben ist die Verminderung der diffusen Methanemissionen aus dem Gülle- bzw. Mistlager (Bachmaier, 2007).

Bei der Bewertung der Erzeugung von Biogas in ökologischen Betrieben ist zu beachten, dass die Substrate zum Teil nicht extra angebaut werden müssen, da sie ohnehin

³ Vorschrift nach EWG2092/91 sind mindestens 60 % Raufuttereinsatz in der Fütterung von Wiederkäuern (Schweiz: mindestens 90 %) Privatrechtliche Anbau-Verbände wie Bioland oder Demeter schreiben zusätzlich mindestens 50 % betriebs eigenes Futter vor.

Bestandteil der ökologischen Fruchtfolgen sind. Es werden Zwischenfrüchte angebaut und es existieren Grünbrachen deren Biomasseaufwuchs bisher in den Boden eingearbeitet wurde. Diese Biomasse steht für eine Nutzung als regenerative Energiequelle zur Verfügung (Möller et al., 2006; Jäger et al., 2005). Der Treibhausgasbilanz der Nutzung dieser Substrate für die Biogasgewinnung sind daher nur der um die alternativen Bewirtschaftungsmaßnahmen verminderte Bergungsaufwand und biogastypische Lagerungs- und Beschickungsaufwand anzulasten.

Besonders muss hervorgehoben werden, dass sich durch die Einführung einer Biogasanlage in ökologisch bewirtschafteten Betrieben neue Düngungsmöglichkeiten ergeben und weitere positive Umwelteffekte erzielt werden können. Der in den meist Leguminosen reichen Zwischenfrüchten gebundene Stickstoff verlässt zunächst die Fläche und kann jetzt kontrolliert zur Düngung eingesetzt werden (Möller et al., 2006; Paulsen & Rahmann, 2005). Damit verbundene Ertragssteigerungen verbessern die produktbezogene Klimabilanz des Verfahrens weiter. Lachgasemissionen und unkontrollierte N-Verluste durch Auswaschung werden so vermindert und der Wuchs und die N-Bindung der Leguminosen werden durch den Verzicht auf das Mulchen bzw. das Abfahren der Grünmasse verbessert (Möller et al., 2006; Heuwinkel et al., 2005).

In ökologischen Betrieben verbessert sich bei der Rückführung der Biogasgülle zur Düngung die produktbezogene THG-Bilanz aufgrund steigender Flächenenerträge. In konventionellen Betrieben könnte sie durch die Einsparung der Produktion von chemisch-synthetischem N-Dünger verbessert werden. Die flächenbezogene THG-Bilanz der beiden Produktionssysteme kann sich daher bei der Einführung von Biogassystemen mit Rückführung von Biogasgülle annähern.

Die Wirtschaftlichkeit der ökologischen Biogaserzeugung bei geringerem Flächenenertrag wird jedoch auch kritisch gesehen. Eine genaue Kenntnis der Rahmenbedingungen der Substratproduktion und Transportentfernungen ist, wie bei der Planung jeder Biogasanlage notwendig und bestimmt neben deren Wirtschaftlichkeit auch die THG-Bilanz (Helbing et al., 2007; Michel et al., 2006; Scholwin & Fritsche, 2007). Insbesondere sollten die positiven Betriebseffekte durch die Nutzung der Biogasgülle zur Düngung konsequent in die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung eingebaut werden. Im Gegensatz zur relativ genauen Kalkulation der erzeugten Gasmenge und deren Nutzung existieren hier jedoch Unsicherheiten über die langfristigen Wirkungen der Nutzung von Biogasgülle auf das Betriebseinkommen ökologischer Betriebe.

5.3.2 Pflanzenöl als Treibstoff

Die Erzeugung von Pflanzenöl (in Deutschland wird zur-

zeit überwiegend Rapsöl betrachtet) und dessen Nutzung als Kraftstoff weist gegenüber der Nutzung von fossilen Kraftstoffen günstigere Treibhausgasbilanzen auf (Gärtner und Reinhardt, 2001). Durch die Flächenbewirtschaftung entstehen jedoch im Gegensatz zur Nutzung fossiler Energien auch landwirtschaftstypische Emissionen (Versauerung, Nährstoffeintrag, Lachgasemissionen), die bei der Produktion von Dieselmotorkraftstoff nicht auftreten (Sergis-Christian & Browsers, 2004). Dies wird in Ökobilanzen dem Rapsöl negativ angerechnet, träte aber bei der Nahrungsmittelproduktion auf diesen Flächen ebenfalls auf. Eine ökologische Produktion von Rapsöl als regenerativem Kraftstoff ist aufgrund der Anbauisiken durch Schädlingsbefall (Kühne und Ulber, 2007) und der hohen Nachfrage im Lebensmittelbereich mit attraktiven Preisen zurzeit nicht absehbar. Jedoch ist die Treibhausgasbilanz ökologisch erzeugten Rapsöls auf ähnlichem Niveau wie bei konventioneller Erzeugung (Sergis-Christian & Browsers, 2004). Beim ökologischen Anbau von Sonnenblumen, ist aufgrund der deutlich höheren Hektarerträge an Öl im Vergleich zu Raps (Reinbrecht & Claupein, 2004) hinsichtlich der produktbezogenen THG-Emissionen eine günstigere Situation zu erwarten. Im Ökologischen Landbau sind heute nur im Sonnenblumenanbau und besonders im Mischfruchtanbau mit Leindotter Erzeugungskosten zu erzielen, die unter denen konventionell erzeugter Rapssaat liegen (Paulsen et al., 2007).

Beim Mischfruchtanbau mit Leindotter wird Leindotter in einem Arbeitsgang gemeinsam mit einer Hauptkultur angebaut (Paulsen, 2007). Der zusätzliche Aufwand für die Bestellung und Ernte ist äußerst gering, so dass sich bei der THG-Bilanz und bei den Emissionen durch die Flächenbewirtschaftung für die Ölerzeugung günstige Werte ergeben (Sergis-Christian & Browsers, 2004). Zusätzlich können durch den Mischfruchtanbau mit seiner verbesserten Unkrautunterdrückung Arbeitsgänge eingespart werden und dadurch der Energieaufwand weiter vermindert werden (Paulsen et al., 2006). Mischfruchtanbausysteme dieser Art sind für den Ökologischen Landbau besonders bedeutend, da begleitende Wirkungen wie die Unkrautunterdrückung und eine Produktivitätssteigerung durch verbesserte Ressourcennutzung das Betriebsergebnis verbessern können. In konventionellen Systemen sind diese Punkte nicht so interessant, da die Möglichkeit einer intensiven Düngung besteht und in Mischkulturen Zulassungsprobleme und Unverträglichkeiten in der Pflanzenschutzmittelanwendung auftreten können.

5.3.3 Holz

Waldwirtschaft: In Wäldern in öffentlicher Hand wird heute vielfach ökologische Waldwirtschaft betrieben. Zielsetzung des Verfahrens ist die Erzeugung eines stabilen

sich selbst regenerierenden Mischwaldes mit standortheimischen Pflanzen (vgl. z. B. Waldbau-Richtlinie, 2004). Eine nach den Richtlinien ökologischer Erzeugung zertifizierte Waldwirtschaft unterscheidet sich von diesen Richtlinien z. B. durch den vollständigen Verzicht auf chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel und den Verzicht von gentechnisch veränderten Pflanzen.

Gegenüber „konventionellen Waldbausystemen“ sind der Verzicht auf Kahlschlag, der Wechsel zum Mischwald und der Verzicht auf Düngungsmaßnahmen, die klimarelevante Unterschiede auslösen können. Positive klimarelevante Aspekte der ökologischen Waldbewirtschaftung wurden vor allem beim Verzicht auf den Kahlschlag in Nadelwäldern gefunden. Beim Einschlag von Einzelbäumen und Nachpflanzen von Buchen wurde freiwerdender Stickstoff aus absterbenden Wurzeln von umliegenden Bäumen aufgenommen und so nicht als Lachgas emittiert (<http://www.zukunftswald.de>). Insofern sind bei der Waldbewirtschaftung nach Ökorichtlinien systembedingte und kontrollierbare Faktoren gegeben, die die Treibhausgasbilanz günstig beeinflussen.

Durch den Umbau von Fichtenmonokulturen zum Mischwald verbessert sich auf nährstoffreichen Standorten die Nährstoffeffizienz der Bestände und es treten zunächst über viele Jahrzehnte geringere Lachgasverluste auf. In den Klimaxgesellschaften z. B. in reinen alten Buchenbeständen können dann nach 100 Jahren höhere Lachgasverluste auftreten. Jedoch ist die vorher durch Bodenstörungen bei der Pflanzung der Bäume verminderte Methanaufnahme dann wieder auf hohem Niveau. Insgesamt bleibt genutzter Wald in jedem Fall eine deutliche Senke für Treibhausgase. Wälder aus ökologischem Waldbau sind langfristig aber ertragreicher als z. B. Fichtenmonokulturen und entziehen damit der Atmosphäre zusätzliches Kohlendioxid (Baumgarten et al., 2005). Über die Wirtschaftlichkeit und internationale Konkurrenzfähigkeit der naturnahen Verfahren gegenüber Kahlschlagverfahren wird gestritten (Fritz & Weber, 2006). Vor allem für kleine Waldbesitzer ist der langfristige Umbau von Fichtenwäldern in Mischwälder mit hohen kurzfristigen Ertragsseinbussen verbunden (<http://www.zukunftswald.de>).

Kurzumtriebsplantagen: Bei der Nutzung von Agrarholz aus Kurzumtriebsplantagen ist ebenfalls eine hohe CO₂-Fixierung zu erwarten (Öko-Institut, 2004). In Abschätzungen von Röhrich (2005) auf der Basis von Hartmann (1995) wird die CO₂-Bilanz dabei durch den Einsatz von Düngemitteln leicht verschlechtert. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass nur auf Grenzertragsstandorten eine mäßige Düngung von Kurzumtriebsplantagen erforderlich ist (Boehlke, 2007; Reinhardt und Scheulen, 2004; Röhrich et al., 2002; Hoffmann, 1998). Eine Düngung kann dabei auch mit organischen Düngern erfolgen. Kurzumtriebsplantagen sind damit prinzipiell auch in ökologischer

Erzeugung mit hoher CO₂-Fixierung möglich (Jørgensen et al., 2005). Eventuelle THG-Emissionen für chemisch-synthetische Dünge- und Pflanzenschutzmittel fallen dort bei ähnlichem zu erwartenden Ertragsniveau nicht an. Jedoch müssten die bei mechanischer Unkrautregulierung zur Bestandesetablierung auftretenden CO₂-Emissionen in der THG-Bilanz angerechnet werden.

Literatur

- ADAS (2000) Energy use in organic farming systems : project report OF0182 to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London [online]. Zu finden in < <http://orgprints.org/8169> > [zitiert am 03.03.2008]
- Anger M, Hoffmann C, Kuhbauch W (2003) Nitrous oxide emissions from artificial urine patches applied to different N-fertilized swards and estimated annual N₂O emissions for differently fertilized pastures in an upland location in Germany. *Soil Use Manage* 19(2):104-111
- Bachmaier J, Gronauer A (2007) Klimabilanz von Biogasstrom : Klimabilanz der energetischen Nutzung von Biogas aus Wirtschaftsdüngern und nachwachsenden Rohstoffen. Freising-Weihenstephan : LfL, 12 p, LfL-Information
- Baumgarten M, Döring C, Fürst C, Jansen M, Jenssen M, Kliins U (2005) Zukunftsorientierte Waldwirtschaft [online]. Zu finden in http://www.zukunftswald.de/do_download.php?table=media&id=17 [zitiert am 03.03.2008]
- BMELV (2007) Agrarpolitischer Bericht der Bundesregierung. Bundestagsdrucksache 15/4801:29
- Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Masse D (2004a) Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows : update review. *Can J Anim Sci* 84(3):319-335
- Boadi DA, Wittenberg KM, Scott SL, Burton D, Buckley K, Small JA, Ominski KH (2004b) Effect of low and high forage diet on enteric and manure pack greenhouse gas emissions from a feedlot. *Can J Anim Sci* 84(3):445-453
- Bockisch F-J (ed) (2000) Bewertung von Verfahren der ökologischen und konventionellen landwirtschaftlichen Produktion im Hinblick auf den Energieeinsatz und bestimmte Schadgasemissionen : Studie als Sondergutachten im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Bonn. Braunschweig : FAL, III, 206 p, Landbauforsch Völknerode SH 211
- Boehlke B (2007) Grundsätze des Anbaus schnellwachsender Baumarten und Ertragspotenziale in Mecklenburg Vorpommern [online]. Zu finden in <http://www.landwirtschaft-mv.de/var/plain_site/storage/original/application/7bf9b6eb9671646e861094150f6d1a1d.pdf> [zitiert am 11.09.2007]
- Capriel P (2006) Standortstypische Humusgehalte von Ackerböden in Bayern [online]. Zu finden in <<http://www.lfl.bayern.de/iab/bodenbearbeitung/22016/index.php>> [zitiert am 03.03.2008]
- Dämmgen U (2007) Calculations of emissions from German agriculture - National Emission Inventory Report (NIR 2007 for 2005 : introduction, methods and data (GAS-EM). Braunschweig : FAL, 243 p, LandbauforschVölknerode SH 304
- DeRamus HA, Clement TC, Giampola DD, Dickison PC (2003) Methane emissions of beef cattle on forages : efficiency of grazing management systems. *J Environ Qual* 32(1):269-277
- Dijkstra J, Kebreab E, Mills JAN, Pellikaan WF, Lopez S, Bannink A, France J (2007) Predicting the profile of nutrients available for absorption : from nutrient requirement to animal response and environmental impact. *Animal* 1(1):99-111
- Dittert K, Lampe C, Gasche R, Butterbach-Bahl K, Wachendorf M, Papen H, Sattelmacher B, Taube F (2005) Short-term effects of single or combined application of mineral N fertilizer and cattle slurry on the fluxes of radiatively active trace gases from grassland soil. *Soil Biol Biochem* 37(9):1665-1674

- Dobbie KE, McTaggart IP, Smith KA (1999) Nitrous oxide emissions from intensive agricultural systems : variations between crops and seasons key variables and mean emission factors. *J Geophys Res* 104:26891–26899
- Dohme F, Machmuller A, Wasserfallen A, Kreuzer W (2000) Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Can J Anim Sci* 80(3):473-482
- El-Hage Scialabba N, Hattam C (2002) (eds) Organic agriculture, environment and food security / Environment and Natural Resources Service, Sustainable Development Department [online]. Zu finden in http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/Y4137E/Y4137E00.htm [zitiert am 03.03.2008]
- Erdmann L, Sohr S, Behrendt S, Kreibich R (2003) Nachhaltigkeit und Ernährung. WerkstattBer / Inst Zukunftsstudien Technologiebewertung 57
- Ellis JL, Kebreab E, Odongo NE, McBride BW, Okine EK, France J (2007) Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *J Dairy Sci* 90(7):3456-3466
- Flachowsky G, Brade W (2007) Potenziale zur Reduzierung der Methan-Emissionen bei Wiederkäuern. *Züchtungskunde* 79(6):417-465
- Flessa H, Dorsch P, Beese F, König H, Bouwman AF (1996) Influence of cattle wastes on nitrous oxide and methane fluxes in pasture land. *J Environ Qual* 25(6):1366-1370
- Flessa H, Ruser R, Dörsch P, Kamp T, Jimenez MA, Munch JC, Beese F (2002). Integrated evaluation of greenhouse gas emissions from two farming systems in southern Germany. *Agric Ecosyst Environ* 91:175-189
- Fließbach A, Oberholzer HR, Gunst L, Mäder P (2006) Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agric Ecosyst Environ* 118(1-4):273-284
- Fritsche U, Eberle U (2007) Treibhausgasemissionen durch Erzeugung und Verarbeitung von Lebensmitteln – Arbeitspapier [online]. Zu finden in <www.oeko.de>
- Fritz P, Weber D (2006) Klausur „Wald und Holz in der Zukunft –Herausforderung für die Forschung“ – Dokumentation [online]. Zu finden in <http://www.nachhaltige-waldwirtschaft.de/fileadmin/Dokumente/Downloads/Foerderschwerpunkt/060116_Doku_Klausur_Wald_und_Holz_in_der_Zukunft.pdf> [zitiert am 11.9.2007]
- Galassi G, Crovetto GM, Rapetti L, Tamburini A (2004) Energy and nitrogen balance in heavy pigs fed different fibre sources. *Livest Prod Sci* 85(2-3):253-262
- Gärtner SO, Reinhardt GA (2001) Gutachten : ökologischer Vergleich von RME und Rapsöl. Heidelberg : Inst Energie- Umweltforsch, 25 p
- Giger-Reverdin S, Morand-Fehr P, Tran G (2003) Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 82(1):73-79
- Granstedt A (2000) Reducing the nitrogen load to the Baltic Sea by increasing the efficiency of recycling within the agricultural system. *Landbauforsch Völkenrode* 50(3-4):95-102
- Haas G, Wetterich F, Köpke U (2001) Comparing intensive, extensified and organic grassland farming in southern Germany by process life cycle assessment. *Agric Ecosyst Environ* 83(1-2):43-53
- Hartmann H, Strehler A (1995) Die Stellung der Biomasse im Vergleich zu anderen erneuerbaren Energieträgern aus ökologischer, ökonomischer und technischer Sicht. Münster : Landwirtschaftsverl, 396, 28 p, Schriftenr Nachhaltigkeitsforschung 3
- Helbig S, Grass R, Hülsbergen KJ (2007) Auswirkungen der Einbindung einer Biogasanlage in ein ökologisches Betriebssystem : effects of integrating a biogas plant into an organic farming system [online]. Zu finden in <http://orgprints.org/9608/> [zitiert am 03.03.2008]
- Heuwinkel H, Gutser R, Schmidhalter U (2005) Auswirkung einer Mulch- statt Schnittnutzung von Klee auf die N-Flüsse in einer Fruchtfolge. *Schriftenr Bayerische Landesanst Landwirtsch* 2005:71-79
- Heyer J (1994) Methan. In: Enquete-Kommission Schutz der Erdatmosphäre des Deutschen Bundestages, Landwirtschaft Studienprogramm, Band 1, Studie C. *Economica Verlag Bonn*:1–91
- Hindrichsen IK, Wettstein HR, Machmuller A, Kreuzer M (2006) Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agric Ecosyst Environ* 113(1-4):150-161
- Hindrichsen IK, Wettstein HR, Machmuller A, Soliva CR, Knudsen KEB, Madsen J, Kreuzer M (2004) Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. *Can J Anim Sci* 84(2):265-276
- Hoffmann C, Anger M, Kühbauch W (2001) N₂O-Freisetzung auf gemähtem Dauergrünland in Abhängigkeit von Standort und N-Düngung. *J Agronomy Soil Sci* 187:153-159
- Hofmann M (1998) Bewirtschaftung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb auf landwirtschaftlichen Flächen. Hann. Münden : Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten, Merkblatt / Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten 11
- Hoyer U, Lemnitzer B, Hülsbergen KJ (2007) Einfluss des ökologischen Landbaus auf unterschiedliche Humuspools im Boden und Schlussfolgerungen zur Humusbilanzierung. In: Zikeli S, Claupein W, Dabbert S (eds) Zwischen Tradition und Globalisierung : Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau ; Universität Hohenheim, 20.-23. März 2007 ; Bd.1. Berlin : Köster, pp 9-12
- Hülsbergen K, Küstermann B (2007) Ökologischer Landbau - Beitrag zum Klimaschutz. *Schriftenr Bayerische Landesanst Landwirtsch* 2007/3:9-22
- Hüther L (1999) Entwicklung analytischer Methoden und Untersuchung von Einflussfaktoren auf Ammoniak-, Methan- und Distickstoffmonoxidemissionen aus Flüssig- und Festmist. Braunschweig : FAL, 225 p, Landbauforsch Völkenrode SH 200
- IPCC (2007) IPCC Fourth Assessment Report, Working Group III, Chapter 8: Agriculture [online]. Zu finden in < <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg3/ar4-wg3-chapter8.pdf>> [Zitiert am 03.03.2008]
- Isermann K (1994) Agriculture's share in the emission of trace gases affecting the climate and some cause-oriented proposals for sufficiently reducing this share. *Environ Poll* 83:95-111
- Jäger P, Döhler H, Hartmann S (2005) Wirtschaftlichkeit der Biogaserzeugung im ökologischen Landbau. *KTBL-Heft* 35:40-45
- Jentsch W, Schweigel M, Weissbach F, Scholze H, Pitroff W, Derno M (2007) Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Arch Anim Nutr* 61(1):10-19
- Jørgensen U, Dalgaard T, Kristensen ES (2005) Biomass energy in organic farming—the potential role of short rotation coppice. *Biomass Bioenergy* 28:237–248
- Kebreab E, Clark K, Wagner-Riddle C, France J (2006) Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: a review. *Can J Anim Sci* 86(2):135-158
- Köpke U, Haas G (1995) Vergleich Konventioneller und Organischer Landbau - Teil II: Klimarelevante Kohlendioxid-Senken von Pflanzen und Boden. *Ber Landwirtsch* 73:416-434
- Körshens M, Rogasik J und Schulz E (2005) Bilanzierung und Richtwerte organischer Bodensubstanz. *Landbauforsch Völkenrode* 1(55):1-10
- Korbun T, Steinfeldt M, Kohlschütter N, Naumann S, Nischwitz G, Hirschfeld J, Walter S (2004) Was kostet ein Schnitzel wirklich? : Ökologisch-ökonomischer Vergleich der konventionellen und der ökologischen Produktion von Schweinefleisch in Deutschland. *Schriftenr IÖW* 171
- Ulber B, Kühne S (2007) Schädlingsbefall an Raps in Rein- und Mischfruchtanbau im ökologischen Landbau. *Landbauforsch Völkenrode SH* 309:96-107
- Küstermann B, Kainz M, Hülsbergen K-J (2007) Modelling carbon cycles and estimation of greenhouse gas emissions from organic and conventional farm-

- ing systems. *Renewable Agric Food Syst* 23 Spec Iss (01):38-52
- Kulling DR, Dohme F, Menzi H, Sutter F, Lischer P, Kreuzer M (2002) Methane emissions of differently fed dairy cows and corresponding methane and nitrogen emissions from their manure during storage. *Environ Monit Assess* 79(2):129-150
- Lampe C, Dittert K, Sattelmacher B, Wachendorf M, Loges R, Taube F (2006) Sources and rates of nitrous oxide application of N-15-labelled emissions from grazed grassland after mineral fertilizer and slurry. *Soil Biol Biochem* 38(9):2602-2613
- Leithold G, Brock C (2006) Humusbilanzierung im ökologischen Landbau [online]. Zu finden in <<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/3134/pdf/LeitholdGuenter-2006-07-28.pdf>> [zitiert am 06.03.2008]
- Leithold G (2003) Humusversorgung im ökologischen Landbau : Analyse und Bewertung des Humushaushaltes mit Hilfe von Humusbilanzen [online]. Zu finden in <<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1446/pdf/Leithold-Guenter-2004-03-04.pdf>> [Zitiert am 03.03.2008]
- Lovett D, Lovell S, Stack L, Callan J, Finlay M, Conolly J, O'Mara FP (2003) Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livest Prod Sci* 84(2):135-146
- Michel J, Weiske A, Kaltschmitt M (2006) Kapitel 7: Ökologische und ökonomische Bilanzierung. In: Möller K, Leithold G, Michel J, Schnell S, Stinner W, Weiske A (eds) *Auswirkung der Fermentation biogener Rückstände in Biogasanlagen auf Flächenproduktivität und Umweltverträglichkeit im Ökologischen Landbau – Pflanzenbauliche, ökonomische und ökologische Gesamtbewertung im Rahmen typischer Fruchtfolgen viehhaltender und viehloser ökologisch wirtschaftender Betriebe* : (Endbericht: DBU – AZ 15074). Giessen, pp 241 ff
- MIDAI (2001) Greenhouse gas mitigation for organic and conventional dairy production (MIDAI) [online]. Zu finden in <http://www.energetik-leipzig.de/Bioenergie/Midair/MIDAI_WP%20summaries.pdf> [Zitiert am 15.03.2005]
- Möller K, Leithold G, Michel J, Schnell S, Stinner W, Weiske A (eds) (2006) *Auswirkung der Fermentation biogener Rückstände in Biogasanlagen auf Flächenproduktivität und Umweltverträglichkeit im Ökologischen Landbau – Pflanzenbauliche, ökonomische und ökologische Gesamtbewertung im Rahmen typischer Fruchtfolgen viehhaltender und viehloser ökologisch wirtschaftender Betriebe* : (Endbericht: DBU – AZ 15074). Giessen, 396 p
- Munroe L, Cook HF, Lee HC (2002) Sustainability indicators used to compare properties of organic and conventionally managed topsoils. *Biol Agric Hortic* 20:201-214
- Murphy D, Röver M, Flachowsky G, Sohler S, Bockisch F-J, Heinemeyer O (2000) Vergleich konventioneller und ökologischer Produktionsverfahren. *Landbauforsch Völknerode SH* 211:109-166
- Naturland (1998) Richtlinien zur ökologischen Walddnutzung. Gräfelfing : Naturland Verband
- Nemecek T, Huguenin-Elie O, Dubois D, Gaillard G (2005) Ökobilanzierung von Anbausystemen im schweizerischen Acker- und Futterbau. *Schriftenreihe der FAL* 58, 156p
- ÖKO (2007) Globales Emissions-Modell Integrierter Systeme (GEMIS). Version 4.4. Darmstadt (www.oeko.de)
- Öko Institut (2004) (ed) *Stoffstromanalyse zur nachhaltigen energetischen Nutzung von Biomasse*. Darmstadt : Öko-Institut
- Paulsen HM, Rahmann G (2004) Wie sieht der energieautarke Hof mit optimierter Nährstoffbilanz im Jahr 2025 aus? *Landbauforsch Völknerode SH* 274:57-73
- Paulsen HM, Schädlich O, Oppermann R (2007) Dezentrale Pflanzenölerzeugung und -nutzung auch in ökologischen Betrieben? In: Zikelki S, Claupein W, Dabbert S (eds) *Zwischen Tradition und Globalisierung : Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau* ; Universität Hohenheim, 20.-23. März 2007 ; Bd. 1. Berlin : Köster, pp 409-412
- Paulsen HM (2007) Mischfruchtanbausysteme mit Ölpflanzen im ökologischen Landbau : 1. Ertragsstruktur des Mischfruchtanbaus von Leguminosen oder Sommerweizen mit Leindotter (*Camelina sativa* L. Crantz). *Landbauforsch Völknerode* 57(1):107-117
- Paulsen HM, Schochow M, Ulber B, Kühne S, Rahmann G (2006) Mixed cropping systems for biological control of weeds and pests in organic oilseed crops. *Asp Appl Biol* 79:215-219
- Penman J, Gytarsky M, Hiraishi T, Kruger D, Pipatti R, Buendia L, Miwa K, Ngara T, Tanabe K, Wagner F (2003) Good practice guidance for land use, land-use change and forestry [online]. Zu finden in <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gpplulucf/gpplulucf.htm> [zitiert am 04.03.2008]
- Post J (2006) Prozessbasierte Modellierung der Bodenkohlenstoffdynamik in Flusseinzugsgebieten unter heutigen und zukünftigen Umweltbedingungen [online]. Zu finden in <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2006/1150/> [zitiert am 04.03.2008]
- Rahmann G, Nieberg H, Drengemann S, Fenneker A, March S, Zurek C (2004) Bundesweite Erhebung und Analyse der verbreiteten Produktionsverfahren, der realisierten Vermarktungswege und der wirtschaftlichen sowie sozialen Lage ökologisch wirtschaftender Betriebe und Aufbau eines bundesweiten Praxis-Forschungs-Netztes. Braunschweig : FAL, 428 p, *Landbauforsch Völknerode SH* 276
- Reinbrecht C, Claupein W (2004) Vergleich der Anbaueignung verschiedener Ölpflanzenarten und -sorten für den Ökologischen Landbau unter den Aspekten Speiseölgewinnung und Eiweißquelle [online]. Zu finden in <www.orgprints.org/4844> [zitiert am 04.03.2008]
- Reinhardt G, Scheulen K (2004) Naturschutzaspekte bei der Erzeugung erneuerbarer Energien [online]. Zu finden in http://www.bfn.de/fileadmin/MDb/documents/naturschutzaspekte_ee.pdf [zitiert am 04.03.2008]
- Röhrich C (2005) Erfahrungen und Ergebnisse im Anbau schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb im Freistaat Sachsen [online]. Zu finden in <http://www.smul.sachsen.de/de/wu/Landwirtschaft/lfi/inhalt/download/Vortrag_SH_18_01_05_roehricht.pdf> [zitiert am 04.03.2008]
- Röhrich C, Kieseewalter S, Groß-Ophoff (2002) Acker- und pflanzenbauliche Untersuchungen zum Anbau ein- und mehrjähriger Energiepflanzen im Freistaat Sachsen. *Schriftenr Sächs Landesanst Landwirtsch* 4
- Rühling I, Ruser R, Kölbl A, Priesack E, Gutser R (2005) Kohlenstoff und Stickstoff in Agrarökosystemen. In: Osinski E, Meyer-Aurich A, Huber B, Rühling I, Gerl G, Schröder P (eds) *Landwirtschaft und Umwelt – ein Spannungsfeld : Ergebnisse des Forschungsverbunds Agrarökosysteme München (FAM)*. München : oekom Verl, pp 99-154
- Ruser R, Flessa H, Schilling R, Beese F, Munch JC (2001) Effect of crop-specific field management and N fertilization on N2O emissions from a fine-loamy soil. *Nutrient Cycling Agroecosyst* 59:177-191
- Scholwin F, Fritsche UR (2007) Kurzstudie Beurteilung von Biogasanlagenparks im Vergleich zu Hof-Einzelanlagen. Darmstadt : Inst Energetik Umwelt
- Sergis-Christian L, Brouwers J (2005) Dezentral hergestelltes, kaltgepresstes Pflanzenöl im ökologischen Vergleich mit Dieselmotorkraftstoff. *Arbeitsergebnisse / AG Land- und Regionalentwicklung am Fachbereich ökologische Agrarwissenschaften der Universität Kassel* : SH 3
- Smith P (2005) Carbon sequestration in croplands : the potential in Europe and the global context. *Landbauforsch Völknerode SH* 280:63-70
- Smukalski M, Rogasik J, Künkel K-J (1992) Landbau und Treibhauseffekt : CO2-Umsatz bei unterschiedlicher Intensität der Landbewirtschaftung. *Landbauforsch Völknerode* 42(2):55-61
- Stolze M, Piorek A, Häring AM (2000) The environmental impacts of organic farming in Europe. *Hohenheim : Institut für Landwirtschaftliche Betriebslehre*, XI, 127 p, *Organic Farming in Europe* 6
- Sundrum A (2002) Systemimmanentes Potential zur Minderung von Emissionen. *KTBL-Schrift* 406:265-277
- Tamminga S (2003) Pollution due to nutrient losses and its control in European

- animal production. *Livest Prod Sci* 84(2):101-111
- Taylor C (2000) Ökologische Bewertung von Ernährungsweisen anhand ausgewählter Indikatoren. Gießen : Univ, 179 p
- UBA (2007) Nationaler Inventarbericht zum Deutschen Treibhausgasinventar : Berichterstattung unter der Klimarahmenkonvention der Vereinten Nationen 1990-2005. Dessau : Umweltbundesamt
- van Knegsel AT, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B (2005) Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod Nutr Dev* 45(6):665-688
- Wagner-Riddle C, Thurtell GW, Kidd GK, Beauchamp EG, Sweetman R (1997) Estimates of nitrous oxide emissions from agricultural fields over 28 months. *Can J Soil Sci* 77:135-144
- Waldbau-Richtlinie 2004 : „Grüner Ordner“ der Landesforstverwaltung Brandenburg. Potsdam : Ministerium Landwirtsch Umweltschutz Raumordnung
- Wiegmann K, Eberle U, Fritsche UR, Hünecke K (2005) Umweltauswirkungen von Ernährung – Stoffstromanalysen und Szenarien [online]. Zu finden in <http://www.ernaehrungswende.de/pdf/DP7_Szenarien_2005_final.pdf> [zitiert am 05.03.2008]
- Williams AG, Audsley E, Sandars DL (2006) Determining the environmental burdens and resource use in the production of agricultural and horticultural commodities : Defra project report ISO205 [online]. Zu finden in <www.sil-soe.cranfield.ac.uk> and <www.defra.gov.uk> [zitiert am 05.03.2008]

Evaluation of future developments in agrobiotechnology: The potential roles of protein nitrogen and sulfur for better crop plants

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Rüdiger Hell¹ and Helke Hillebrand²

Abstract

Agricultural biotechnology provides a whole array of measures to improve crop plants. In addition to the commercially already successful traits of herbicide and insect resistance as well as currently developed traits of biofuel plants as renewable resources the improvement of yield and quality of crops using nutrient-based traits is an innovative approach. Balanced supply of nitrogen and sulfur in combination with transgenic traits bears the potential to improve seed nutritional value as well as to enhance defense against plant pathogens.

Keywords: plant biotechnology, crop improvement, nitrogen, nutritional value, sulfur

Zusammenfassung

Bewertung zukünftiger Entwicklungen in der Agrarbiotechnologie: Das Potential von Stickstoff und Schwefel in Proteinen zur Verbesserung von Nahrungspflanzen

Die landwirtschaftliche Biotechnologie stellt eine Vielzahl neuer und die Züchtung ergänzender Ansätze zur Verbesserung von Nahrungspflanzen zur Verfügung. Zusätzlich zu den bereits kommerziell verwendeten Merkmalen der Herbizid- und Insektenresistenz sowie den gegenwärtig entwickelten Sorten für die Erzeugung erneuerbarer Energien stellt die Entwicklung ernährungsbasierter Merkmale eine innovative Strategie dar. Die ausbalancierte Versorgung mit Schwefel und Stickstoff in Kombination mit geeigneten transgenen Merkmalen hat das Potential den Ernährungswert von Saatgut zu erhöhen und darüber hinaus die Abwehr gegen Pathogene zu verbessern.

Schlüsselwörter: Ernährungswert, Pflanzenbiotechnologie, Pflanzenzüchtung, Schwefel, Stickstoff

¹ University of Heidelberg, Institute of Plant Sciences, Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg/Germany; Email: rhell@hip.uni-heidelberg.de

² BASF AG, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen/Germany

1 Introduction

Nitrogen and sulfur are essential macronutrients for plants and need to be balanced to achieve optimal yield and quality. Deficiencies in nitrogen, phosphorus, potassium but also sulfur, although being the least required one of the six macronutrients, are limiting factors for plant productivity, notably in high-yield agriculture. Nitrogen and sulfur applications need to be monitored to achieve optimized nutrient use efficiency. The genetically defined nitrogen:sulfur (N:S) ratio in proteins of a plant is only sustained if vegetative growth enhanced by nitrogen fertilizers is matched by sulfur availability (Oenema and Pastma, 2003). Nutrition during vegetative or generative growth strongly affects not only grain yield but also composition and thus quality. The term quality in this context can refer either to biological or technological value. This may be illustrated by barley varieties for beer brewing that have higher carbon:nitrogen (C:N) ratio and sulfur contents compared to barley used for food and feed in order to optimize flavour development after fermentation. Sulfur supply and concomitant sulfur content of storage proteins are known to be important for baking quality of bread wheat (Zhao et al., 1999).

Traditionally, crop plants were not bred under conditions of nutrient limitation. Therefore, increased biomass production and improved protein composition as realized with new cultivars significantly enhance the demand for nutrients that is conventionally met by organic or inorganic fertilization. Such new cultivars today also include transgenic crops. All crop plants that underwent breeding processes (by crossing or laboratory methods) are genetically altered *per se*. Thus, the term 'genetically modified organism' or GMO for plants that have been engineered by gene transfer methods is avoided here (Hell and Hillebrand, 2006). Such cultivars are instead named transgenic plants. Yield increase achieved by using transgenic crop plants carrying the currently dominating traits insect resistance and herbicide tolerance (see below) can be treated in the same way as conventionally altered crops with respect to mineral nutrient requirement. Due to the fact that nitrogen applications usually exceed 100 kg/ha, reports on specific nitrogen deficiencies of transgenic crops are rare, suggesting no extra nutrient requirements for production of the currently planted varieties (Crosby, 2003; Powell, 2006). However, other nutrients, such as sulfur, may be required in particular crop improvement strategies. Breeding and biotechnology aim at the improvement of sulfur relations at several levels, but most importantly in sulfur-rich seed storage proteins. Apart from lysine and some other amino acids, cysteine and especially methionine are often limiting the nutritional value of food and feed for humans and non-ruminant animals (Tabe and Higgins,

1998; Baker, 2006). A new sulfur-related approach to stabilize yield during pathogen attack is based on the activation of sulfur metabolism and, most likely, optimized sulfur nutrition (Kruse et al., 2005; Rausch and Wachter, 2005; Bloem et al., 2007; Kruse et al., 2007). It therefore seems advisable to carefully analyze the physiology of each individual trait within the context of existing crop plant varieties to achieve optimal production. The following article will evaluate the potential of sulfur compounds containing nitrogen for seed quality and plant defense in view of the currently used biotechnological approaches.

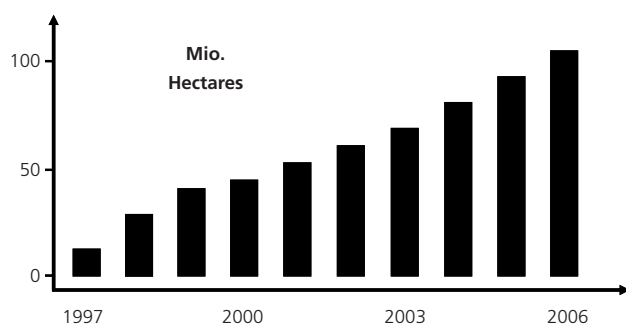
2 Global situation of agricultural biotechnology with respect to transgenic crops

Agrochemistry including fertilization management today forms one major option to close the gap between food and feed production and the nutrient energy requirements of a continuously growing world population of an estimated 6.6 billion in 2008. Improved agricultural techniques and breeding, particularly the so-called 'green revolution', formed a second pillar of productivity increase to close this gap in the past. Additional concepts to enhance plant production for food and feed are required to meet the challenges of sustained productivity, increasing world population and decreasing fertility of soils due to erosion and irrigation. Agricultural biotechnology is such a third option to meet these challenges using combinations of conventional breeding with marker-assisted breeding and/or gene transformation into crop plants, respectively. So far, commercial production of transgenic plants aimed at improved and stable yield using two major traits: herbicide tolerance and insect resistance or the combination of both. Reduced input levels of plant protection chemicals such as herbicides or insecticides for the existing transgenic crops at equal or higher yields per acre are meanwhile a sound contribution to sustainable agricultural practices. Crop plants with improved nutrient use efficiency for nitrate and phosphate would constitute an important contribution to further sustain and manage arable soils.

Today, about 7 % of the world's acreage is planted with transgenic seeds. Commercial production of transgenic crop plants to a large extent takes place in the Americas and Asia while Europe is clearly lagging behind. The main effort is observed in Spain leading the European adoption of transgenic crops with only some 60,000 ha of Bt-maize being planted. Although the de-facto moratorium in Europe was lifted in 2004, the European Union's regulatory process for transgenic plants is very slow and complex. In Australia, the federal states of New South Wales and Victoria have revoked the moratoria to the cultivation of transgenic crop plants of 2004 and will allow the planting of oilseed rape early 2008. The two states produce about

50 % of the 1.5 million tons of oilseed rape annually produced in Australia. In Africa, depending on the country, legal regulations allow cultivation of transgenic crops.

The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA; <http://www.isaaa.org>), a non-profit organization for transfer of crop biotechnology applications, lists the global area planted with transgenic crops in more than 20 countries in 2006 as 102 million hectares, up from 90 million hectares in 2005 (Figure 1). Average annual increases of about 10 % were representative since the beginning of commercialization in the USA in 1997 and similar increase rates can be expected for the near future, in particular if India and China legalize large scale cash cropping of transgenics plants. The four major crop species so far were, almost exclusively, soybean, maize, oil seed rape (canola) and cotton. In 2005 71 % of these carried transgenes for herbicide resistance, 18 % for *Bacillus thuringiensis*-based (Bt) insect resistance and 11 % for the combination of Bt and herbicide resistance. Both resistances belong to the group of input traits that have been defined as mostly producer oriented and affect agricultural performance properties. Their main advantages are the improvement of plant vigor and biomass to enhance and stabilize yield. This first generation accounts for almost all currently planted transgenic crops. Future traits, including some sulfur and nitrogen use efficiency based improvements, refer to rather consumer-oriented approaches and are called output traits. These are designed to enhance mainly nutritional quality or processing characteristics.



Source: ISAAA, 2007, see text.

Figure 1:
Increase of area cultivated with transgenic plants in million hectares

3 Improvement of seed sulfur contents

Sulfur and nitrogen based improvements aim at the protein composition of vegetative or generative plant parts, respectively. The demand for better nutritional value of seeds is largely based on the requirement of humans and non-ruminant animals for the essential amino acid me-

thionine. Cysteine is required for infants and can serve as substrate for the trans-sulfurylation pathway to form methionine, thus complementing a large part of methionine requirement in adults (Müntz et al., 1998). These nutritional properties are especially important for humans in geographical areas where vegetarian dominated diets based on only few staple crops for caloric intake, for example rice or lentils. For high-yield animal production (poultry and monogastric animals) the diets are mostly mixtures of grains of the legume and the cereal families. Leguminosae (e.g. soybeans) are known to be relatively low in methionine and cysteine but high in lysine. In contrast, cereals (e.g. wheat) are notoriously low in lysine but in comparison high in sulfur amino acids, although these are still regarded as targets for improvement (Wang et al., 2003). Thus, mixtures of diet components are provided to compensate for these shortcomings in amino acid composition described above. However, these measures often are still insufficient to achieve maximal animal production and give rise to supplementation by methionine, lysine and several other amino acids to enhance the biological value of feed (Müntz et al., 1998). In the past, amino acids for feed have been chemically produced but are nowadays increasingly being replaced by fermentation products (Leinfelder and Heinrich, 1995). Energetically more efficient and sustainable would be grains with enhanced contents of nutritionally valuable factors, in particular cysteine and methionine.

In such a way fortified food and feed components are expected to be provided by plant biotechnology in transgenic crops using so-called push and pull approaches. Push approaches try to enhance input or biosynthetic activity of a pathway hoping that the endproduct will accumulate. In case of cysteine and methionine it is not the concentration of free metabolites but the amount of reduced sulfur incorporated into storage protein that is relevant, since in seeds 20 - 40-times more sulfur can be bound in proteins compared to free sulfur amino acids (e.g. Chiaiese et al., 2004). Figure 2 indicates where push approaches have been attempted in the sulfur assimilation pathway. Mostly model species such as tobacco and Arabidopsis or species that are relatively easy to transform, e.g. potato or rice,

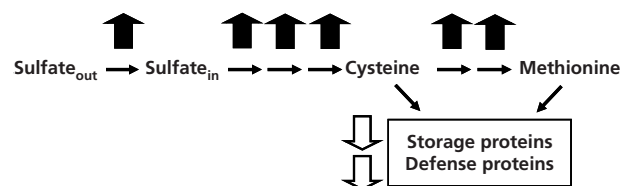


Figure 2:
Simplified scheme of transgenic approaches to enhance contents of sulfur amino acids in seeds or for defense reactions. Push approaches are shown by black arrows, pull approaches by open arrows.

have been used so far to avoid costly try-and-error experiments in transformation processes of major grain crops such as soybean and corn. In summary, these approaches resulted in moderate increases of free sulfur amino acids but did not yield to proportionally higher content in protein-bound sulfur. In summary, the results of approaches targeting the engineering of storage proteins were never anywhere near the requirements defined by food health organizations and industry (for review see Hesse et al., 2004; Sirko et al., 2004; Galili et al., 2005; Hesse and Hoefgen, 2008). In this context it is interesting to note that manipulation of mineral nitrogen uptake other than fertilization was also of little success (Hell and Hillebrand, 2001) and may thus indicate general problems of mineral uptake regulation.

In pull approaches an artificial sink in form of e.g. over-expression of sulfur-rich proteins under the control of a seed-specific promoter is introduced. So far, mostly legumes (soybean, pea, lupin, vetch) but also rice have been transformed as prominent nitrogen-rich food and feed constituents. Several experiments achieved remarkable results using sulfur-rich seed storage proteins such as the sunflower 2S albumin (SSA) that carries 7.5 % cysteine and 15.5 % methionine on weight basis: Feeding trials with rats using transgenic lupin seeds resulted in significant weight increases (Molvig et al., 1997). These pull approaches appear to be promising, but still run below the expected rates of sulfur contents (de Lumen et al., 1999). Several reasons may account for this observation. They include the plasticity of seed composition in response to nitrogen and sulfur availability (Tabe et al., 2002; Chiaiese et al., 2004), the complex processing and packing of storage proteins (Shutov et al., 2003) and the different allocation patterns of oxidized and reduced compounds used for sulfur and nitrogen transport in different plant types (Anderson and Fitzgerald, 2001). These robust developmental and metabolic programs show remarkable plasticity and have evolved over many generations to ensure survival of these plant species. They need to be studied in detail before they can be outwitted by plant biotechnologists.

4 Activation of sulfur-based defense against fungal pathogens

Sulfur-rich proteins in vegetative as well as seed are important components of the plant's defense reaction to pathogens. Sulfur-containing compounds in general are intimately connected to biotic stress resistance (Rausch and Wachter, 2005; Hell and Kruse, 2006). Whether or not sulfur nutrition affects a plant's ability to form protective sulfur compounds is currently under investigation (Kruse et al., 2007). The increased tolerance of oilseed rape against fungal pathogens in field experiments when

optimally supplied with sulfate was termed 'sulfur-induced resistance' and was recently reviewed by Bloem et al. (2007). Controlled growth chamber experiments using the model plant *Arabidopsis thaliana* and established microbial pathovars defined the term 'sulfur-enhanced defense' (SED) and separated the resistance effect from nitrogen application effects (for review see Kruse et al., 2007). A number of sulfur compounds are probably jointly responsible for the improved tolerance against pathogens (Hell and Kruse, 2006). These observations open the possibility to engineer and select for new plant varieties. However, the well-known glucosinolates of the Brassicaceae family, although rich in nitrogen and sulfur, are probably unrelated to SED. The pungent taste of the preformed glucosinolates deters feeding insects that destroy the cells. The release of the stored glucosinolates together with the degrading enzyme myrosinase results in breakdown products including isothiocyanates that exhibit toxicity to the feeding insects. While some degradation products such as sulphoraphane are classified as candidates for promotion of human health and cancer prevention and protection by activation of phase I and II detoxification enzymes (Finley, 2005), their efficiency against bacterial and fungal pathogens is seen as controversial (Burow et al., 2008). More likely involved in defense against microbes are the sulfur-containing phytoalexins of the camalexin group that are only produced upon fungal and bacterial infection in Brassicaceae plants. Camalexin shows toxicity *in vitro* against both kinds of pathogens (Tsuji et al., 1992). Elemental sulfur is a taxonomically far more wide-spread defense compound in plants than camalexins (Cooper et al., 1996; Williams and Cooper, 2003). S⁰ can exist preformed but may also be induced upon infection and accumulates in vascular tissue to prevent the spread of infections along the plant transport routes.

Sulfur-rich proteins are probably the group with strongest impact on plant pathogen defense. They comprise several classes including thionins, defensins, lipid-transfer proteins, snakins and others, according to their primary amino acid sequences (Garcia-Olmedo et al., 1998). Sulfur-rich proteins share a small size of 4 - 11 kDa, have a mostly polar amino acid composition and several disulfide bridges (2 to 6) amounting to 10 - 20 % of total residues provide a compact tertiary structure. Most of the known thionins and defensins carry predicted signal peptides for secretion into the apoplast, hence are localized at the primary infection sites in leaves and seeds. Some are preformed, but most plants contain gene families encoding thionins and defensins the expression of which is induced upon infection with fungal pathogens. It needs to be investigated whether reduced sulfur is sufficiently available for fast synthesis of sulfur-rich proteins under less than optimal sulfur supply, thereby reducing the defense potential

of the plant (Kruse et al., 2007). Relatively little is known about the precise physiological functions and mechanisms of toxicity of sulfur-rich proteins but they have been tested comprehensively *in vitro* against phytopathogenic bacteria, oomycetes and fungi, showing varying degrees of activity (Bohlmann and Apel, 1990; Thomma et al., 2002; Kruse et al., 2005, for review). The thionins and defensins appear to be most important for plant defense and thus constitute attractive targets for genetic engineering approaches. A great variety of suitable fungal test strains was used to assess the biocidal properties of these proteins. A comprehensive selection is listed in patents US 5.942.663, US 5.919.018 and US 5.986.176.

Thionin or defensin genes are potentially valuable traits in crop plants, achieved either by transgenic overexpression or marker-assisted introgression into elite lines. An early example was the constitutive overexpression of a thionin that resulted in enhanced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Fusarium oxysporum* infection (Epple et al., 1997). A more applied approach of defensin expression was the transformation of rice with the Wasabi defensin known from Japanese Radish (*Wasabia japonica*; Kanzaki et al., 2002). The Wasabi defensin had been selected due to its toxicity against the rice blast disease, a globally acting fungal pathogen. In transgenic rice lines the Wasabi defensin caused resistance levels comparable to a rice cultivar carrying the true blast resistance gene used as a positive control in leaf lesion tests. The resistance was stable over several generations, suggesting a durable and wide-spectrum field resistance against various rice blast races (Kanzaki et al., 2002). However, despite a considerable list of successful approaches (Kruse et al., 2005), it should be cautioned that a number of experiments failed to confer resistance for unknown reasons (Broekaert et al., 1995; De Bolle et al., 1996; Epple et al., 1997).

The publicly limited availability of information on genetics, genomics, comprehensive gene expression data and metabolomics of the majority of crop plants in combination with elaborate and costly transformation protocols slow down progress in agricultural biotechnology of specialty crops. Further research into a wider variety of crop plant species and their wild relatives will greatly support progress towards the identification and exploration of additional sulfur-rich proteins and compounds with suitable defense properties.

Acknowledgement

R.H. wishes to thank the German Science Foundation (DFG) for financial support within Research Group 383.

References

- Anderson JW, Fitzgerald MA (2001) Physiological and metabolic origin of sulfur for the synthesis of seed storage proteins. *J Plant Physiol* 158:447-456
- Baker DH (2006) Comparative nutrition and metabolism : explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:17897-17902
- Bohlmann H, Apel K (1991) Thionins. *Annu Rev Plant Physiol* 42:227-240
- Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW (1995) Plant defensins : novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol* 108:1353-1358
- Burrow M, Wittstock U, Gershenzon J (2008) Sulfur-containing secondary metabolites and their role in plant defense. *Adv Photosynthesis Respir* 27:205-226
- Cooper RM, Resende MLV, Food J, Rowan MG, Beale MH, Potter U (1996) Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* 379:159-162
- Crosby L (2003) Commercial production of transgenic crops genetically engineered to produce pharmaceuticals. *BioPharm Intern* 2003(Apr):60-67
- De Bolle MF, Osborn RW, Goderis IJ, Noe L, Acland D, Hart CA, Torrekens S, Van Leuven F, Broekaert WF (1996) Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus* : expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 31:993-1008
- De Lumen BO, Galvez AF, Revilla MJ, Krenz DC (1999) Molecular strategies to improve the nutritional quality of legume proteins. In: Shahidi F, Kolodziejczyk P, Whitaker JR, Munguia AL, Fuller G (eds) *Chemicals via higher plant bioengineering*. New York : Kluwer, pp 117-127
- Epple P, Apel K, Bohlmann H (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9:509-20
- Finley JW (2005) Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot* 95:1075-1096
- Galili G, Amir R, Hoefgen R, Hesse H (2005) Improving the levels of essential amino acids and sulfur metabolites in plants. *Biol Chem* 386:817-831
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47:479-91
- Hell R, Berkowitz O, Enneking D, Hillebrand H, Jost R, Kronberg K, Schmiedeburg L, Wirtz M (2003) Macronutrient metabolism in crop plants : problems and perspectives. *Atti Societa Italiana di Chimica Agraria* 20:181-190
- Hell R, Hillebrand H (2001) Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Curr Opin Biotechnol* 12:161-168
- Hell R, Hillebrand H (2006) Plant biotechnology. In: Wink M (ed) *An introduction to molecular biotechnology : molecular fundamentals, methods and applications in modern biotechnology*. Weinheim : Wiley-VCH, pp 556-582
- Hell R, Kruse C (2007) Sulfur in biotic interactions of plants in their environment. In: Hawkesford MJ, Kok, LJ de (eds) *Sulfur in plants : an ecological perspective*. Dordrecht : Springer, pp 197-224
- Hesse H, Hoefgen R (2008) Metabolism of methionine in plants and phototrophic bacteria. In: Hell R, Dahl C, Knaff C, Leustek T (eds) *Sulfur metabolism in phototrophic organisms*. Berlin : Springer Netherlands, pp 95-112
- Hesse H, Kreft O, Maimann S, Zeh M, Hoefgen R (2004) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 55:1799-1808
- Kanzaki H, Nirasawa S, Saitoh H, Ito M, Nishihara M, Terauchi R, Nakamura I (2002) Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theor Appl Genet* 105:809-814
- Kruse C, Jost R, Hillebrand H, Hell R (2005) Sulfur-rich proteins and their agrobiotechnological potential for resistance to plant pathogens. *Landbauforsch*

- Völkenrode SH 283:73-80
- Kruse C, Jost R, Lipschis M, Kopp B, Hartmann M, Hell R (2007) Sulfur-enhanced defence : effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biol* 9:608-619
- Leinfelder W, Heinrich P (1995) Process for preparing O-acetylserine, L-cysteine-related products. German patent WO97/15673
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJV (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:8393-8398
- Müntz K, Christov V, Saalbach G, Saalbach I, Waddell D, Pickardt T, Schieder O, Wüstenhagen T (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung* 42:125-127
- Oenema O, Pastma R (2003) Managing sulfur in agroecosystems. In: Arbol YP, Ahmad A (eds) *Sulphur in plants*. Dordrecht : Kluwer Acad Press, pp 45-70
- Powell D (2006) Impact of transgenic canola on growers, industry and environment [online]. Zu finden in <<http://www.foodsafetynetwork.ca>> Complete report (2001) <http://www.canola-council.org/manual/GMO/gmo_main.htm>
- Rausch T, Wachter A (2005) Sulfur metabolism : a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10:503-509
- Sirko A, Blaszczyk A, Liszewska F (2004) Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants : a survey of effects. *J Exp Bot* 55:1881-1888
- Sors TG, Ellis DR, Salt DE (2005a) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* 86:373-389
- Shutov AD, Baumlein H, Blattner FR, Müntz K (2003) Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *J Exp Bot* 54:1645-1654
- Tabé L, Hagan N, Higgins TJ (2002) Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Curr Opin Plant Biol* 5:212-217
- Tabé L, Higgins TGV (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Sci* 3:282-286
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216:193-202
- Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC (1992) Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 98:1304-1309
- Williams JS, Cooper RM (2003) Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. *Physiol Mol Plant Pathology* 63:3-16
- Zhao F, Salmon SE, Withers PJA, Monaghan JM, Evans EJ, Shewry PR, McGrath SP (1999) Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulfur nutrition under field conditions. *J Cereal Sci* 30:19-31

In vitro regeneration of gerbera

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Gihan M. Hussein¹, Ismail Ahmed Ismail¹, Mahmoud El Saied Hashem², Salah Mahmoud El Miniawy² and Naglaa A. Abdallah³

Abstract

A system for *in vitro* regeneration of adventitious shoots from callus was developed in current work. Callus was formed from *in vitro* juvenile leaf explants of the Gerbera "*Gerbera jamesonii*" on 58 different MS-based media containing different concentration and combinations of plant growth regulators, i.e., BAP, Kin, Zeatin, NAA, IAA and ABA. Two different shoot formation media were evaluated, both contain 2 mg/l NAA but they have different concentration of BAP (2.0 and 4 mg/l). The highest shoot regeneration frequency was 36.6 % which was obtained on induction medium containing 2 mg/l BAP and 0.25 mg/l ABA and shoot formation medium containing 2 mg/l of each of BAP and NAA. Regenerated shoots were successfully rooted on MS medium containing 40 µg/l NAA.

Keywords: *Gerbera jamesonii*, regeneration, BAP (benzylaminopurine), NAA (α-naphthalenacetic acid), IAA (indole acetic acid)

Zusammenfassung

In vitro Regeneration von Gerbera

Ein System für die *in vitro* Regeneration von „*Gerbera jamesonii*“ wird vorgestellt.

Es wurden 58 verschiedene Kombinationen von Medien und Wachstumsreglern geprüft. Das beste Regenerationsergebnis wurde bei mit 36,6 % auf einem Induktionsmedium mit 2 mg/l BAP und 0.25 mg/l ABA erzielt.

Schlüsselwörter: *Gerbera jamesonii*, Regeneration, BAP (Benzylaminopurin), NAA (α-Naphthalenessigsäure), IAA (Indolessigsäure)

¹ Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), Agricultural Research Center (ARC), Giza/Egypt; Email: gghosny@gmail.com

² Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo/Egypt

³ Department of Genetic, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza/Egypt

1 Introduction

Gerbera (*Gerbera jamesonii*) is a valuable ornamental species grown as a potted plant as well as for cut flowers. It is considered one of the most economically important cut flower in the world. Egypt with its warm weather can be considered a good location for cut flowers production. Furthermore, the Europe market has increased its demand of gerbera in the recent years. Therefore, the gerbera growers are looking for a novel gerbera generation with excellent characters of color, stem length, petal shape, vase life and others to expand their market in Europe. Plant breeding, besides producing better crop plants, has also focused on species that are attractive and have aesthetically valuable characteristics. Traditionally, breeding of ornamental plants has been based mainly on continuous crossing and selection for combining commercially important characteristics into elite genotypes (Elomaa et al., 1993). However, two or three cycles of inbreeding result in degenerate progeny, malformations and sterility occur frequently in these species because of its allogamous mode of reproduction. Therefore, the establishment of inbred lines by conventional selfing methods was found to be difficult (Cappadocia and Vieth, 1990). Developments in tissue culture and methods of molecular genetics now give an alternative approach to change single characteristics in these genotypes. Furthermore, possibilities of producing completely new characteristics are no longer limited by the natural genetic variation existing in the target species, since genes of any origin can be transferred into the pre-existing gene pool. In previous work, adventitious gerbera shoots were regenerated primarily from flower buds of greenhouse-grown plants (Pierik et al., 1973; Pierik et al., 1975 and Laliberte et al., 1985). However, the regeneration of shoots from leaf blades was successfully obtained by Hedtrich (1985). On the other hand, Jerzy and Lubomski (1991) were the first to demonstrate effective regeneration of adventitious shoots from *in vitro* explants of 28 gerbera cultivars. In this work shoots were regenerated directly from petioles or from obtained calli at the base of petioles. Similarly, Orlikowska et al. (1999) regenerated gerbera from callus produced from petioles of the youngest 3 - 4 leaves detached from axillary shoots produced *in vitro*. In addition, bud regeneration was obtained from a clone of *Gerbera hybrida* Bol. L. leaf explants by Reynoired et al. (1993). Kumar et al. (2004) were able to regenerate adventitious shoots from leaf and petiole pieces of *Gerbera jamesonii*. They reported that about 75 - 77 % of the calli from both types of the explants which produced 12 - 15 shoots/callus.

Agrobacterium-mediated gene transfer method have been established before for a commercial gerbera variety, but still, to date, general transformation protocols suitable

for a range of elite varieties have not been developed. Elooma et al. (1993) used *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation to introduce an antisense gene for chalcone synthase into cv. Terra Regina. Whereas, Nowak et al. (1997) introduced the *gus* and *npt II* marker genes into five gerbera cultivars using *Agrobacterium* mediated transformation. In the present investigation, an attempt has been performed to develop regeneration system in *Gerbera jamesonii* using the juvenile leaves as explants in order to improve the breeding work to be more efficient and rapid for producing gerbera plants which have novel-desired traits.

2 Materials and methods

2.1 Cultures condition

In vitro gerbera (*Gerbera jamesonii*) var. SHTC3 plantlets were kindly obtained from SHTC Company, (Egypt). All regeneration and transformation treatments were carried out using the MS medium (inorganic salt MS medium, Murashige and Skoog, 1962), containing 30 g/l sucrose and solidified with 2.8 g/l phytagel. The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. Plant materials were maintained at 28 °C ±2 for 16 h light cycle.

2.2 Explant preparation

The juvenile leaves with their petioles from the *in vitro* propagated plantlets were used as a source of explants. These leaves were excised at early stage of differentiation and the axillary buds were removed at their proximal ends then incubated in culture room for seven to ten days until producing the juvenile leaves.

2.3 Callus induction stage

Explants were evaluated for their ability to produce callus by culturing on 53 MS-based media containing different concentration and combination of plant growth regulators (Table 1). Each treatment consisted of 100 explants derived from juvenile leaves with 10 explants/plat and the experiment was repeated twice. Cultures were incubated for 3 - 4 weeks and the reported data are mean of the two experiments.

2.4 Shoot formation

In order to evaluate the shoot formation ability, the produced calli were cultured on two different shoot formation media (2B and 4B), both contain 2 mg/l NAA but with different concentration of BAP, one has 2.0 mg/l (2B) and the other has 4 mg/l (4B). The calli which did not produce

Table 1:

Composition of callus induction media

Medium	Growth hormones (mg/l)		Medium	Growth hormones (mg/l)	
	BAP	NAA		BAP	ABA
Ge1	1.0	0	Ge32	0.5	0.1
Ge2	1.5	0	Ge33	1	0.4
Ge3	2.0	0	Ge34	1.5	0.5
Ge4	3.0	0	Ge35	1.0	0.5
Ge5	1.0	0.5	Ge36	2.0	0.25
Ge6	1.5	0.5	Ge37	3.0	0.25
Ge7	2.0	0.5	Ge38	1.0	0.25
Ge8	3.0	0.5	Ge39	2.0	0.5
Ge9	1.0	1.0	Ge40	3.0	0.5
Ge10	1.5	1.0		BAP	ZEA
Ge11	2.0	1.0	Ge41	0.1	0.1
Ge12	3.0	1.0	Ge42	0.2	0.2
Ge13	1.0	2.0	Ge43	0.5	0.5
Ge14	1.5	2.0	Ge44	1.0	1.0
Ge15	2.0	2.0	Ge45	1.5	1.5
Ge16	3.0	2.0	Ge46	2	3
Ge17	0.2	0.15	Ge47	2.5	3.5
Ge18	0.5	0.2	Ge48	3	2
Ge19	1.0	0.5	Ge49	3.5	2.5
	Kin	NAA		BAP	NAA
Ge20	1.0	0	Ge50	2	
Ge21	2.0	0	Ge51	2	0.1
Ge22	3.0	0	Ge52	2	
Ge23	1.0	0.5	Ge53	2.5	0.45
Ge24	2.0	0.5	Ge54	5.0	
Ge25	3.0	0.5	Ge(A)	2.00	
Ge26	1.0	1.0	Ge(M)	2.0	0.1
Ge27	2.0	1.0	Ge(P)	2.5	0.45
Ge28	3.0	1.0	Ge (T)	5.0	
Ge29	1.0	2.0			
Ge30	2.0	2.0			
Ge31	3.0	2.0			

shoots after 3 - 4 weeks were re-cultured on fresh shoot formation media.

2.5 Root formation and adaptation

The produced shoots were transferred to the rooting medium containing 40 µg/l NAA Hussein (2003) and incubated for 3 - 4 weeks. Subsequently, rooted plantlets were acclimatized in pots containing soil composed of peat-moose: sand: clay (1:1:1, v:v:v), covered with plastic bags to increase the humidity and grown under a photoperiod of 16/8 h (light/dark) in controlled greenhouse conditions. Plants were hardened by removing the plastic bags after 7 - 10 days.

3 Results

A regeneration system for gerbera was established using the juvenile leaf explants and MS media with different hormone combinations for producing callus. It was observed from the obtained results that not all media could promote the callus formation, in addition, callus formation percentage varied from 0 to 95 among the media. It was recorded that only five media (Ge36, GeA, GeM, GeP and GeT) showed high percentage of callus formation ranged between 90 - 95 %. After few days of culturing the explants enlarged and most of calli were formed on the petiole bases. It is also obvious that few shoots regenerated

from the callus during incubation on the callus induction media (data not shown). Produced calli enlarged and became yellow-brown nodular semi compact calli (Figure 1). Subsequently, the organogenic calli produced on different media were transferred to two different shoot formation media to evaluate their ability to shoot development. The unresponded calli were transferred to a fresh medium for another 3 - 4 weeks. The regeneration efficiency was calculated during the first and the second 4 weeks and they varied among the treatments. Generally, medium 2B containing 2 mg/l BA and 2 mg/l IAA revealed higher shoot development percentage (ranged between 6.6 to 36.6) than the medium 4B which containing 4 mg/l BAP and 2 mg/l IAA (ranged between 3.0 to 28.3), except in the case of using callus produced from medium GeP which gave 13.30 % on the first period and 15 % on the second. However the highest regeneration efficiency (36.6) was obtained on media Ge36/2B. Shoots were performed during 3 - 8 weeks as it gave a percentage of 16.6 responded calli at the first incubation period and a percentage of 20 at the second incubation period as shown in Table 2. Figure 2 illustrate the shoot regeneration from callus on shoot formation medium. The number of produced shoots/callus was taken in consideration, data in Table 2 show that the average numbers of shoots/callus were higher during the first 4 weeks than that produce during the second, except in that case of the GeP calli. The mean number of shoots regenerated per callus ranged from 1.00 to 2.60 during the first period while it ranged between 1 to 2.5 shoots/callus during the second. The highest number of shoots/

callus was obtained with media Ge36/2B, however, the lowest was on media GeP/2B.

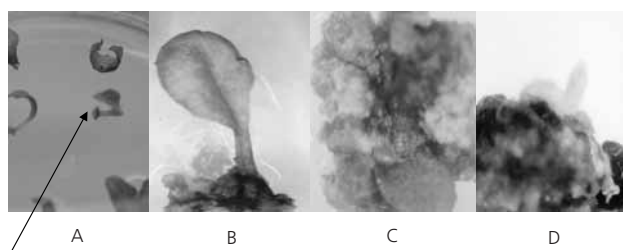


Figure 1:

Callus formed from the juvenile leaf explants of gerbera
A: Juvenile leaf explants. B: Callus produced at the end of petioles of about 2 weeks. C: Produced callus after 3 weeks. D: Bud initiation from callus during maintaining on the callus induction medium.

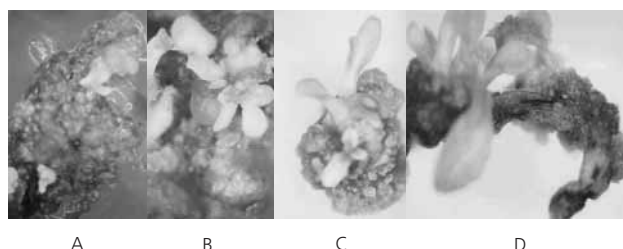


Figure 2:

Developed gerbera shoot obtained from the compact callus during 3 - 4 weeks of subculturing on shoot differentiation medium

Developed shoots were successfully rooted when culturing on medium composed of MS supplemented with 40 µg/l NAA. Roots started appearing after seven to ten

Table 2:

Shoot formation rate of gerbera calli obtained on different induction media

Media		First subculture		Second subculture		Total % of responded callus of 2 months
		% of responded callus after one month	Average number of shoots/callus	% of responded callus after two months	Average number of shoot/callus	
Ge36	2B	16.6	2.60	20.0	1.25	36.6
	4B	3.00	1.00	10.0	1.00	13.00
GeA	2B	26.60	1.30	0.00	0.00	26.60
	4B	10.0	2.50	0.00	0.00	10.00
GeM	2B	6.60	1.00	0.00	0.00	6.60
	4B	3.00	2.00	15.0	1.50	18.0
GeP	2B	10.0	1.00	0.00	0.00	10.0
	4B	13.30	1.25	15.0	2.50	28.30
GeT	2B	20.0	1.50	0.00	0.00	20.0
	4B	6.60	1.50	25.0	1.20	2.50

days of subculturing. All of the transferred shoots produced roots during the 3 - 4 weeks (Figure 3). Rooted plants were then acclimatized in the greenhouse as described before (Figure 4).



Figure 3:
Rooted gerbera plantlets on the rooting medium after 3 weeks



Figure 4:
Gerbera plants under acclimatization stage

4 Discussion

The establishment of a transformation method is an integrated process that involves many different factors, such as the choice of explant, culture conditions, and transformation (Dessoky et al., 2006). Various factors involved in the regeneration have been considered, including developmental stage of the leaves, growth regulators in the culture medium and genotype dependent (Reynoird et al., 1993 and Orlikowska et al., 1999). We established a long term regeneration system of gerbera (*Gerbera jamesonii*) using the juvenile leaf as an explant. Previous work for gerbera regeneration showed that petioles of the youngest 3 - 4 leaves detached from auxillary shoots produced *in vitro* were successfully used as explants (Reynoird et al., 1993; Jerzy and Lubomski, 1991; Orlikowska and Nowak, 1997; Orlikowska et al., 1999 and Kumar et al., 2004). In current study, a protocol including one month of callus induction stage and 3 - 8 weeks of shoot formation stage

with two phases has been applied on gerbera (*Gerbera jamesonii*) var. SHTC3. This protocol gave a rate of shoot regeneration efficiency of 36.6 %. The use of long-term regeneration protocol for gerbera is requested (Orlikowska et al., 1999) for successful transformation, as it is important that regeneration is maintained over a relatively long period in which organic calli is first produced from single transformed cells, then shoots are regenerated from calli. In addition, Orlikowska and Nowak, (1997) reported that directly regenerated shoots were either not transformed or not stably transformed. In current study, the maximum callus induction and growth were on all media containing BAP at different concentration. Aswath and Choudhary (2002) and Kumar et al. (2004) reported that BAP produced compact, nodular callus from gerbera leaves or petioles. Our results refer that the range of the main number of regenerated shoot/callus is ranged between 1.0 and 2.6 which depend on the media as well as the phase of shoot formation stage. The obtained number of shoots/callus is near to the results obtained previously with Orlikowska et al. (1999), they stated that it dependent on genotype and recorded that it ranged from 1.9 to 2.5 shoots in the first passage but it increased from 4.4 - 7.3 shoots in the fourth passage. However, Kumar et al. (2004) obtained high numbers of regenerated shoots/explants as it reached upto 11 shoots/explant. Results obtained in this work showed that the roots were successfully developed on 40 g/l NAA. Presence of NAA was also used but in combination with BAP for root formation by Kumar et al. (2004). Aswath and Choudhary (2002) successfully rooted the gerbera shoots on NAA, IAA or free hormone medium.

Acknowledgement

This work has been carried out under the program of the Biotechnology Research Grant. The program is administrated by AERI Institutional Linkage Project, Midwest Universities Consortium for International Activities (MUCIA), Inc. and University of Illinois.

References

- Aswath CR, Choudhary ML (2002) Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. Acta Bot Croat 61:125-134
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol Biol 20:1195-1197
- Cappadocia M, Vieth J (1990) *Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook : *in vitro* production of haploids. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry 12
- Dessoky ES, Gihan H, Sadik AS, Naglaa A (2006) Efficient regeneration and *agrobacterium*-mediated transformation systems in melon (*Cucumis melo* L.). Egypt J Gen Cytol 45:35-47
- Elooma P, Honkanen J, Puske R, Seppänen P, Helarittutta Y, Mehto M, Kotilainen

- M, Nevalainen L, Teeri TH (1993) *Agrobacterium*-mediated transfer of anti-sense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology* 11:505-508
- Hedtrich CM (1979) Regeneration of shoots from leaves and propagation of *Gerbera jamesonii*. *Gartenbauwiss* 44:1-3
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann LN, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231, *HortScience* 26:908-910
- Jerzy M, Lubomski M (1991) Adventitious shoot formation on ex vitro derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scientia Horti* 47:115-124
- Kumar S, Kanwar JK, Sharma DR (2004) *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* Bolus from leaf and petiole explants. *J Plant Biochem Biotechnol* 13:73-75
- Laliberte S, Chrestien L, Vieth J (1985) *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *HortScience* 20:137-139
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15:473-497
- Nowak E, Makowska Z, Kucharska D, Orlikowska T (1997) The influence of initial explant on transformation effectiveness of *Gerbera hybrida*. *Biotechnologia (Poznan)* 4:27-38
- Orlikowska T, Nowak E (1997) Factors affecting transformation of gerbera. *Acta Horti* 447:619-621
- Orlikowska T, Nowak E, Marasek A, Kucharska D (1999) Effect of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 59:95-102
- Pierik RLM, Steegmans HHM, Marelis JJ (1973) *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. *Sci Horti* 1:117-119
- Pierik RLM, Jansen JLM, Maasdam A, Binnendijk CM (1975) Optimization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. *Sci Horti* 3:351-357
- Reynold JP, Chriqui D, Noin M, Brown S, Marie D (1993) Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several gerbera species. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:203-210

A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Ghada A. Abu-El-Heba¹, Gihan M. Hussein¹ and Naglaa A. Abdalla^{1,2}

Abstract

Tomatoes have great economic importance in greenhouse and field production in Egypt. Tissue culture and molecular engineering have provided rapid modes to develop desirable varieties of cultivated plant species. Genetic engineering will allow adding new fruit quality genes, one at a time, with simultaneous avoiding introduction of the rouge characteristics. In this work, rapid regeneration and transformation systems of tomato cultivar CastleRock has been developed using hypocotyl with a part of cotyledon (hypocotyledonary), after removal of primary meristem, as an explant. The explants were cultured on ten different combinations of hormones and vitamins. The highest frequency and earliest regeneration were obtained on medium X1N which composed of MS medium supplemented with 1 mg/l BAP, 1 mg/l Zeatin ripozide, 5mg/l AgNO₃ and Nitch&Nitch vitamin. Shoots were developed after only 10 - 12 days with a percentage of 92 %. In addition, transformation system has been established with two different methods, *Agrobacterium* mediated transformation and Biolistic gun. In the case of *Agrobacterium* transformation, the binary vector pISV2678 which contains the *gus*-intron and *bar* genes was used. While, the plant vector pMON-RTG harboring the *gus* gene was used with biolistic gun transformation. Putative transgenic shoots were regenerated on the selected regeneration medium and developed shoots were transferred to rooting media. T₀ plants were analyzed using histochemical *gus* assay and the PCR.

Keywords: *Agrobacterium* mediated transformation, biolistic gun

Zusammenfassung

Ein schnelles und effizientes Sytem zur Regeneration und Transformation von Tomaten

Die Arbeit beschreibt ein Verfahren zur schnellen und effizienten Regeneration und genetischen Transformation der in Ägypten weitverbreiteten Tomatensorte "Castle Rock". Ausgangsmaterial ist das Hypocotyl der Pflanze mit einem Teil des Keimblattes nach Entfernen des primären Meristems. Die besten Regenerationsraten wurden auf einem MS Medium mit Zusatz von 1 mg/l BAP, 1 mg/l Zeatin ripozide, 5 mg/l AgNO₃ und Nitch&Nitch Vitamin erzielt. 92 % der Ansätze entwickelten bereits nach 10 - 12 Tagen Sprösslinge. Zur genetischen Transformation wurden *Agrobacterium* und eine Gen-Kanone eingesetzt.

Schlüsselwörter: *Agrobacterium* vermittelte Transformation, Gen-Kanone

¹ Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), Agricultural Research Center (ARC), 12619 Giza/Egypt; Email: gghosny@gmail.com

² Departments of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, 12619 Giza/Egypt

1 Introduction

Tomato is a major vegetable crop that has achieved tremendous popularity over the last century and it is grown in almost every country of the world. Tomatoes breeding programs can highly benefit of biotechnological tools, such as gene transfer technology, which allows the introduction of foreign genes into a germplasm, without modifying the genetic background of elite varieties. However, a breeding program associated to biotechnological tools depends upon the development of an efficient *in vitro* plant regeneration system. *In vitro* plant regeneration of tomatoes using protocols for adventitious shoot regeneration from cotyledon segments has been reported (vanRoekel et al., 1993). The system is based on three culture steps (Dong & Jia, 1991): a bud induction phase, culturing the explants in medium supplemented with cytokinin (Compton and Gray, 1993); an elongation phase, transferring the shoot buds to medium with a lower concentration of cytokinin (Dong and Jia, 1991); and a rooting phase, using a culture medium supplemented with auxin (Compton and Gray, 1994; Abu El-Heba, 2004).

The hormones auxin and cytokinin control plant development through a multitude of complex interactions. The balance between auxins and cytokinins controls the formation of roots, shoots, and callus tissue *in vitro* (DeRopp, 1954 and Skoog and Miller, 1957). The mode of interaction between auxins and cytokinins can therefore be synergistic, antagonistic, or additive and is dependent on the type of tissue and on the plant species in which the interaction occurs. Although the molecular mechanisms underlying most of these auxin-cytokinin interactions are unknown, they are thought to include mutual control of auxin and cytokinin metabolism, interactions in the control of gene expression, and posttranscriptional interactions (Coenen and Lomax, 1997).

In vitro regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis can be used for multiplication of genetically identical clones and it is an integral part of genetic transformation procedures. The *in vitro* morphogenetic responses of cultured plants are affected by different components of the culture media and it is important to evaluate their effect on plant regeneration. Although advances are being made toward better understanding of metabolic processes correlated with regeneration (Lambe' et al., 1997; Canirney et al., 2000), determining of the conditions for *in vitro* plant regeneration is still largely an empirical process. Thus, *in vitro* regeneration can be difficult to achieve for some plant species or particular genotypes within a species.

Development of protocols for *in vitro* selection can provide new advances for the production of stress tolerant cultivars (Bhatia et al., 2004). The use of a combination

of molecular and conventional breeding techniques could be the option for the development of cultivars resistant to biotic and abiotic stresses. Transformation frequency is one of the most important limiting factors in obtaining transgenic plants. In addition, a reliable regeneration protocol for the target plant material is another important parameter. Therefore, prior the transformation work, plant regeneration conditions have to be optimized for a given plant species and type of explant (Potrykus et al., 1995). Somatic embryogenesis in tomato is still at its infancy, and efficient procedures for large-scale production *via* somatic embryogenesis are yet to be developed (Bhatia et al., 2004). Tomato regeneration has been previously reported *via* organogenesis in several articles using different explants, such as, leaf (McCormic et al., 1986 and Gaffer, 1997 and Öktem et al., 1999) and cotyledon (vanRoekel et al., 1993). In addition, Pozueta-Romero, et al. (2001) regenerated shoots of three tomato cultivars after 14 days from the hypocotyl after removing the primary and axillary meristems. This paper attempts to develop efficient protocols for tomato transformation and *in vitro* regeneration with a high and rapid regenerative ability using the proximal part of hypocotyl as explants.

2 Materials and methods

2.1 *Agrobacterium* strain and plant vector

A. tumefaciens strain LBA4404 (Horsch et al., 1985) containing a disarmed Ti plasmid was transformed with the binary plasmid pSV2678, which has *gus*-intron under the control of e35S promoter and *nos* terminator as well as *bar* gene under the control of *nos* promoter, AMV leader and pAg7 terminator within the T-DNA region. The binary vector was kindly provided by Dr. P. Ratet, Institut des Sciences Vegetables (ISV), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif-Sur-Yvette, France.

The plasmid pMONRTG harboring the *gus* gene under the control of enhanced cauliflower *mosaic virus* (e35S CaMV) promoter and NOS terminator was used to adapt plant transformation with biolistic gun.

2.2 Tomato regeneration

All cultures of regeneration and transformation treatments were carried out on MS salts supplemented with sucrose (3 %), phytigel (0.28 %) and the pH was adjusted to 5.8 before autoclaving (121°C, 20 min). *In vitro* cultured plant materials were incubated in a controlled growth chamber at 25 °C $\pm$ 2 and 8/16 hr (dark/light) photoperiod.

2.3 Explant preparation

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. CastleRock seeds were used as explant sources. Seeds were surface sterilized for 25 min, in commercial bleach solution (2.5 % NaClO) and rinsed three times in distilled water. The seeds were germinated on hormone free MS medium solidified with 0.6 % (w/v) agar and incubated at 27°C in the dark for three days then they were maintained under photoperiod of 16 h illumination for another 5 days. The hypocotyl explants of *in vitro* grown seedlings were excised from the 7-day-old seedling and the cotyledons were cut into two parts followed by removing the bud from the proximal part by a sharp scalpel.

2.4 Shoot regeneration

Hypocotyl explants from 7 days old seedlings were incubated on different regeneration media to identify the best formulation for inducing shoot organogenesis. The compositions of these different media are listed in Table 1. A total of 10 explants per plate were cultured, ten plates per treatment were used in a completely randomized block design, and the whole experiment was repeated three times. The efficiency of shoot regeneration was based on the number of regenerated explants having shoots. The mean of the shoots numbers per explants in each treatment was counted.

The elongated shoots were excised individually and transferred onto half MS medium supplemented with 0.1 mg/l IAA for rooting (Lee et al., 1997). Three weeks later, the shoots which failed to form roots were trimmed and replanted on the fresh rooting medium. Subsequently, rooted plantlets were acclimatized in pots containing soil composed of peat-moose: sand: clay (1:1:1, v:v:v), then covered with plastic bags to increase the humidity and grown under controlled greenhouse with a photoperiod of 16/8 h (light/dark) conditions. Plants were hardened by removing the plastic bags gradually after 7 - 10 days.

2.5 Transformation via biolistic gun

The biolistic gun and plasmid pMONRTG have been used for transferring the *gus* gene. Gold particles were prepared and coated with plasmid pMONRTG DNA according to BioRad protocol. Explants were prepared and cultured in the middle of Petri dishes contained the suitable shoot formation medium then they were shooted with the pMONRTG DNA coated gold particles. These explants were shooted twice under pressure of 1350 psi once at sample plate distance 6 cm and the second at 9 cm as recommended by Abu El-Heba (2004). Thereafter, bombarded explants were cultured on shoot formation medium and each experiment was performed through three replicas. The number of explants in each replica was 60 with a total number of 180. The data was recorded based on the mean of this experiment.

2.6 Agrobacterium mediate transformation

Suspension of *A. tumefaciens* LBA4404-pISV2678 was prepared as follows: two ml Luria-Bertani (LB) broth that contained 100 mg/L kanamycin and 50 µM 3', 5-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosyringone) were inoculated with *Agrobacterium* and grown 16 h at 28 °C with vigorous shaking. An aliquot of 100 µl from the culture was used to inoculate 10 ml of a LB broth that contained 100 mg/L kanamycin and incubated at 28 °C with vigorous shaking until the absorbance at 550 nm was between 0.4 - 0.8 (equivalent to early log phase for most of the *Agrobacterium* strains). The cells were then pelleted and resuspended in an MS basal liquid medium. The hypocotyls were inoculated by dunking in an *Agrobacterium* suspension for 10 - 15 min. After inoculation in this suspension, the explants were blotted dry on sterile filter paper, replated onto the suitable shoot formation medium and cocultivated for 3 days under optimized growth conditions. After cocultivation, the explants were transferred to a shoot induction media that contained 250 µg/L

Table 1:
Composition of shoot formation media used for induction of shoot organogenesis from tomato hypocotyls

Media	MS	XM	X1B	X1N	X2B	X2N	X3B	X3N	X4B	X4N
MS vitamin	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
B5 vitamin	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–
Nitch&Nitch vitamin	–	–	–	+	–	+	–	+	–	+
BA (mg/l)	–	1	1	1	–	–	–	–	–	–
2iP (mg/l)	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–
Ziatin R (mg/l)	–	–	1	1	–	–	–	–	–	–
ABA (mg/l)	–	–	–	–	–	–	0.25	0.25	0.25	0.25
Silver Nitrate 5mg/l	–	–	5	5	5	5	5	5	5	5

bialaphos and 300 mg/L carbinicillin (both antibiotics were added as filter sterilized solutions after autoclaving) to select transformed shoots and prevent bacterial growth. After an additional 2 weeks of incubation in culture, the number of elongated shoots was counted. The elongated shoots were excised individually from the explants and subcultured on rooting media that containing 250 µg/L bialaphos. The experiment had three replica 50, 110 and 90 explants with a total number of 250 explants.

2.7 Regeneration of transformed explants

Transformed explants of both methods were then transferred to suitable shoot formation medium, the developed shoots were transferred to the rooting medium, and finally the plantlets were acclimatized in the greenhouse. The established putatively transgenic tomato plants were designated as T0-generation plants. A set of the untransformed explants were also regenerated as negative controls.

2.8 PCR assay

The genomic DNA of tomato was extracted from young leaves of putative transgenic plants by the method of Delaporta et al. (1983) and used in PCR analyzes. Two pairs of specific primers were used to detect the transgenes in putative transformed plants. The *bar* specific primers (namely P1, 5'AAA AGC TTC CAC CAT GAG CCC AGA ACG ACG3' and P2, 5'AAG GAT CCT CAG ATC TCG GTG ACG G') was designed to amplify 540 bp of the *bar* coding sequence, while the *gus* gene specific primers (namely, P3, 5'CCA GAT CTA ACA ATG CGC GGT GGT CAG TCC C3' and P4, 5'CCA GAT CTA TTC ATT GTT TGC CTC CCT GCT GC3') were designed to amplify the whole open reading frame (with or without the intron). The PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µl, containing 1 µl DNA, 20 pmol of each primer, 200 µM each dNTP, 0.5 units *Taq* DNA polymerase and 3 µl 10 PCR buffer. The PCR temperature profile was as follows: initial denaturation of DNA at 94 °C for 5 min, 35 cycles comprised of 1 min denaturation at 94 °C, 1 min annealing at 55°C for *gus* gene or 60 °C for *bar* gene, 1 min elongation step at 72 °C followed by a final extension step at 72 °C for 7 min. Amplification products were analyzed by electrophoresis on 1 % agarose gels and detected staining with ethidium bromide.

2.9 Histochemical GUS assay

Histochemical analysis of GUS activity in transformed explants, young leaves, roots and stem of transformed tomato plants using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-d-glucuronide (X-Glu) as a substrate was carried out as described

by Jefferson (1987). Following tissue-staining with X-Glu overnight at 37 °C, chlorophyll from leaves and pigments from fruits were removed by soaking these tissues in a mixture of 70 % ethanol and 10 % commercial bleach Clorox for 4 ± 6 h. The ethanol bleach mixture was replaced three or four times then washed with double distilled H₂O.

2.10 Herbicide tolerance in transgenic plants

The upper surfaces of five fully expanded leaflets of plants grown in the greenhouse were thoroughly wetted by painting with Basta (200 g/L of glufosinate ammonium; Hoechst) solution containing 2 mg/ L of PPT. Tolerance to PPT was scored 7 day after leaf painting.

3 Results and discussion

The *in vitro* morphogenic responses of cultured plant tissues are affected by the different components of the culture media, especially by concentration of growth hormones, and it is therefore important to evaluate their effects on plant regeneration. Tomato is one of the most studied higher plants because of its importance as a crop species, and of several advantages for genetic, molecular and physiological studies (McCormick et al., 1986).

Development of an efficient protocol for tomato transformation and its subsequent regeneration is a prerequisite for the production of transgenic plants. Previous data for tomato regeneration have been reported using cotyledon explants (Raj et al., 2005 and (vanRoekel et al., 1993) and leaf explants (McCormic et al., 1986 and Gaffer, 1997 and Öktem et al., 1999). In this study, a rapid shoot regeneration system of tomato cv. CastleRock via direct shoot organogenesis using the proximal zone of the hypocotyl was established. In addition, transformation using biolistic and *Agrobacterium*-systems were adopted.

3.1 Effect of culture media on shoot organogenesis

It is important to optimize the regeneration frequency of tomato to increase the likelihood of recovery of transformants, therefore 10 media (Table 1) were evaluated for their regeneration ability of the hypocotyl explants of cv. CastleRock. The explants derived from hypocotyls, were isolated from seedlings of CastleRock tomato cultivar. Hundred explants were cultured on each type of MS medium supplemented with growth regulators. Previous studies demonstrated that 8 to 10 day old cotyledons of tomato were superior to other sources of explants, including hypocotyls, stems and leaves for promoting shoot organogenesis of tomato (Hamza and Chupeau, 1993; VanRoekel et al., 1993; Ling et al., 1998). In our experiments 8-day-old *in vitro* seedlings were used as source of explants.

The different formulations were designed based on a general survey of the most likely growth regulators and their concentrations that have been reported to promote shoots from hypocotyl tissues of tomatoes. The frequency of adventitious shoot regeneration differed depending on the type and concentration of growth regulators added to the regeneration medium. Since all media formulations induced shoot in all hypocotyl explants (Figure 1), the evaluation of shoot induction was based on the percentage of the regenerated shoots in each treatment and number of shoots per explants. Result represented in Table 2 shows that the three media X1N, X1B and XM which contained 1mg/l BA and 5mg/l silver nitrate but X1N and X1B contained 1mg/l Ziatin ripozide, induced the highest (3.5) mean shoots per explant compared to other media (1.5). Obtained results revealed that the regeneration frequency varied from 40 - 92 %. The highest regeneration frequency was obtained with medium X1N as it gave a percentage of 92 % followed by both media X1B and XM (90 % for both). It was also observed that these three media (X1N, X1B and XM) were the earliest among the other media in producing shoots as the shoots started to differentiate during 7 - 10 days while the others needed about 3 weeks. Furthermore, produced shoots on these three media were developed within 2 - 3 weeks compared to the other seven media, which had to be re-cultured in a fresh medium to develop. The number of shoots/explant

Table 2:

Regeneration frequency of tomato hypocotyls on ten different regeneration media

Media	% of no. of explant with shoots	No. of shoots/explants	Time of shoot differentiation
MS	40	1	6 weeks
XM	90	3 - 4	15 days
X1B	90	3 - 4	15 days
X1N	92	3 - 4	10 - 12 days
X2B	60	1	2 - 3 weeks
X2N	62	1	2 - 3 weeks
X3B	45	1	3 weeks
X3N	43	1	3 weeks
X4B	65	2	3 weeks
X4N	60	2	3 weeks

were also considered as they were 3 - 4 shoots/explant for these three media compared to 1 - 2 shoots/explant for the other media. It was also recorded that there was no difference among the media containing B5 vitamins and that containing Nitch and Nitch vitamins. Therefore, the X1N medium was selected to use in the transformation routine work. This finding suggested presence of the cytokinins BA and zeatin in the culture medium had an invigorating effect on cell differentiation in tomato hypocotyl. The presence of BA in the culture medium has long been reported to promote shoot organogenesis in a large number

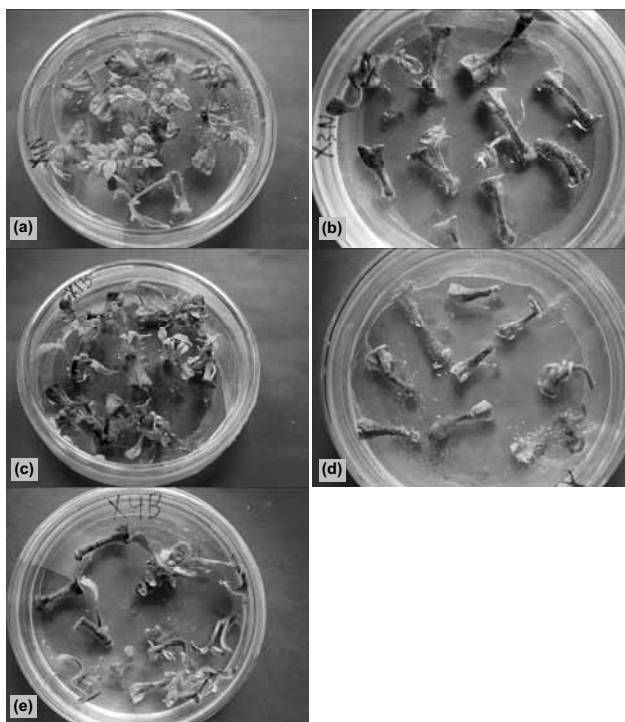


Figure 1:
 Regeneration performance of cultivar tomato CastleRock using the proximal zone of hypocotyl as an explant on different shoot formation media



Figure 2:
 (a) Putatively transformed shoot, b) Rooted plants after 3 to 4 weeks on rooting media, and c) Acclimatized putatively transgenic plants under the biocontainment greenhouse.

of plant species (Huetteman and Preece, 1993). Nogueira et al. (2001) observed high regeneration frequency 92 % or 85 % on cotyledonary explants of the tomato genotype Santa Clara or its natural mutant Firme, respectively.

Our experiments supported the results of other authors (Ichimura and Oda 1995; Nogueira et al., 2001) who found that the most efficient medium for *in vitro* regeneration of tomato being induction medium supplemented with a cytokinin zeatin.

The developed shoots excised and transferred to the rooting media for 2 - 3 weeks. Only 75 % of shoots were successfully formed roots at the first 3 weeks. However, reculturing the unrooted shoots on the free medium which enhanced them to form roots after 2 - 3 weeks. Tomato regeneration of proximal zone of the hypocotyl explants performing direct organogenesis is illustrated in Figure 2.

3.2 Tomato transformation

Two methods (biolistic bombardment and *Agrobacterium* mediated systems) were evaluated for their efficiency in the tomato transformation using the hypocotyl explants. The use of biolistics has the advantage of allowing a fast analysis, but it has to be adapted to the specific characteristics of the plant tissue.

In the case of biolistic bombardment, hypocotyls were bombarded with pMONRTG coated gold particles, containing the eCaMV 35S promoter was fused to the *gus* gene, to optimize the transformation assay. This promoter has been shown to be functional in transgenic strawberry fruits (El Mansouri et al., 1996; Jiménez-Bermúdez et al., 2002 and Dessoky et al., 2006). The main parameters that can be optimized in the biolistic transformation of plant tissue are the size of the gold particle, the distance between the sample and the macro-carrier, the amount of DNA used in each bombardment, as well as the number of shots per sample (Sanford et al., 1993). The distances between the sample and the macro-carrier as well as the number of shots per sample were optimized for tomato transformation. The addition of an osmoticum to the bombardment medium has been shown to increase the efficiency of transformation in a number of tissues, since it provides osmotic support for the tissue and minimizes cell damage (Baum et al., 1997; Sanford et al., 1993). Transformation system was carried out as previously established by the author (Abu El-Heba, 2004) using cotyledons as explant source. It was clearly observed that 13500 psi bombardment pressure with two shots and 6 cm distances between the sample and the macro-carrier were needed to detect activity of the reporter gene over the background level. The shoot regeneration frequency of tomato hypocotyl explants decline after the bombardment. The explants having shoots varied among the replica from 38 - 45 explants

with a total number of 124 explants, representing 68.9 % (Table 3). The low regeneration efficiency obtained after the bombardment treatment might be due to harmful effects of this technique on the plant tissues, as the explants did not culture on the selection medium. Therefore the transformation efficiency was calculated based on the PCR analysis. Transformation of intact plant organs by particle bombardment has proved to be a useful approach to study the promoter activity of organ-specific genes, as the transformed cell can be monitored in its native organ environment (Goff et al., 1990; Potrykus, 1991).

Table 3:

Regeneration frequency of tomato hypocotyl explants after bombarded with the pMONRTG coated gold particles

Replicates	Number of explants	Surviving explant	
		No.	%
R1	60	45	75
R2	60	38	63.3
R3	60	41	68.3
Total	180	124	68.8

In the case of the second method, hypocotyl explants were wounded and infected with *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring the binary vector pLSV2678. In tomato, the effect of the *Agrobacterium* concentration for co-cultivating cotyledon explants was previously described by Fillatti et al. (1987). They found that when the concentration of the bacteria increased or decreased from 5.108 bacteria per ml, the rate of transformation was reduced by at least 20 %. The hypocotyl explants were co-cultivated with selected *Agrobacterium* conjugant. These explants, were cultured on selection medium and incubated until the putative transformed shoots were formed. It was important to subculture the explants onto a fresh selection medium at least once after 10 days to promote faster shoot formation, and to prevent *Agrobacterium* regrowth. Results showed that the surviving explants on bialaphos medium ranged among the replica from 25 - 32 explants with a total number of 250, representing 34 % transformation efficiency (Table 4).

Endogenous GUS activity was detected in transformed explants, leaves, stems, and roots of transgenic plants explants. Bialaphos-resistant shoots produced via *Agrobacterium* mediated transformation strategy were randomly selected and subjected to a histochemical assay and visually compared with non-transformed plant materials (Figure 5). A percentage of about 85 % of the tested plant materials developed blue color whereas, there was no GUS expression was observed in untransformed plants. In addition, transient *gus* gene expression was detected of ten explants of each bombarded treatment were examined.

Table 4:

Transformation frequency of the tomato hypocotyl explants produced via *Agrobacterium* on selection medium

Replicates	Number of explants	Surviving explant	
		No.	%
R1	50	25	50
R2	110	32	29
R3	90	28	31.1
Total	250	85	34

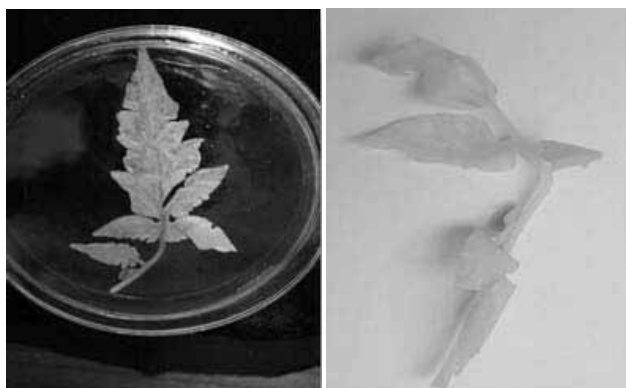


Figure 5:

Histochemical *gus* assay for transgenic and non-transgenic tomato plant using *Agrobacterium* transformation

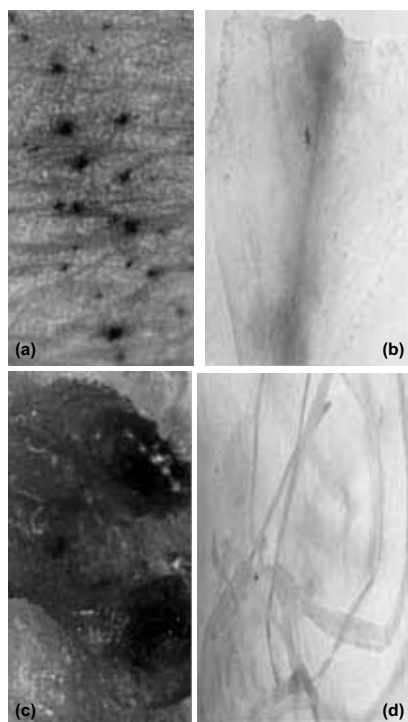


Figure 6:

Histochemical GUS assay for different transgenic tomato parts
(a) Blue spots after 48 hr of explant shooting, (b) Tomato leaf, (c) Tomato new bud and (d) Tomato root.

Results showed that all of those shoots obtained varied number of blue spots which have been observed under the binocular microscope (Figure 6 a). Furthermore, GUS expression has been also performed to all parts of developed plants grown in the greenhouse (Figure 6 b, c and d).

Varying levels of GUS activity, independent of a stable or transient expression of a reporter, were detected in leaf tissues of CaMV 35S transgenic plants. This observed difference in tissue specificity might be attributed to post-transcriptional regulation of GUS expression, as has been previously reported (D'Aoust et al., 1999).

Putative transformed shoots obtained from both treatments were transferred to soil for acclimatization. The survived tomato transformants were then transferred to the greenhouse, and allowed to grow until fruiting. From each transformation experiment, putative transgenic plants were analyzed for the presence of the chimeric *uidA* gene for both methods and the *bar* gene for the *Agrobacterium* transformation using PCR. The putative transgenic plants of T0-generation when screened by PCR using specific primers of transgenes. Although this plants gave an expected PCR amplicon no such amplicon was observed in untransformed (negative control) plants. Transgenic plants produced from direct transformation with the plasmid pMONRTG were able to amplify a fragment of ~1.8kb (Figure 3) while transformed plants with the binary vector pISV2678 amplified ~2kb for *gus*-intron gene and 540 bp (Figure 4) for *bar* gene transformed using specific primers for each gene. It was recorded that only 65 out of 150 (putatively transformed plants with pISV2678) and 53 out of 200 (putatively transformed plants with pMONRTG) plants were confirmed to be transgenic, representing a percentage of 30 and 26.5, respectively. Seven transgenic plants from each group (transformed either with pMONRTG or pISV2678) were used for *uidA* gene expression studies.

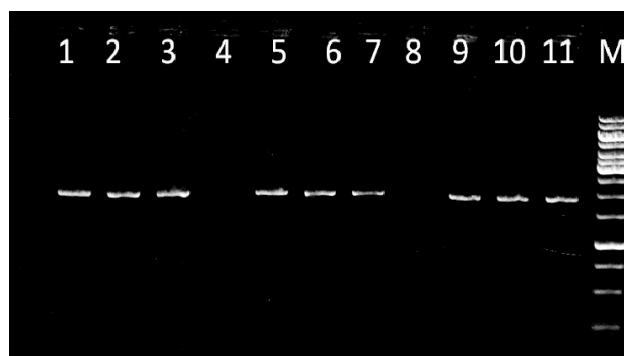


Figure 3:

PCR screening for the presence of *gus* gene in putative transgenic tomato plants using biolistic gun



Figure 4:

PCR screening for the presence of *gus* – intron (lane 1-9) & *bar* (11-19) genes in putative transgenic tomato plants using *Agrobacterium* transformation

References

- Abu El-Heba (2004) Evaluation of some promoter's activity of some DNA plant viruses. Ain Shams : Univ, PhD thesis
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, Midmore D (2004) Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell Tissue Organ Cult 78(1):1-21
- Coenen C, Lomax TL (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants : old problems and new tools. Trends Plant Sci 2(9):351-6
- Compton ME, Gray DJ (1993) Shoot organogenesis and regeneration from diploid, triploid and tetraploid watermelon. J Amer Soc Hort Sci 118:151-175
- Compton ME, Gray DJ (1994) Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. HortScience 29(3):211-213
- D'Aoust MA, Nguyen-Quoc B, Yelle S (1999) Upstream regulatory regions from the maize Sh1 promoter confer tissuespecific expression of the GUS gene in tomato. Plant Cell Rep 18:803-808
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version III. Plant Mol Biol 1:19-21
- DeRopp R (1954) Kinetin and auxin activity. Plant Physiol 31:253-254
- Dessoky ES, Hussein G, Sadik AS, Abdallah NA (2006) Efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation systems in melon (*Cucumis melo* L.). Egypt J Genet Cyt 35:35-74
- Dong JZ, Jia SR (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Rep 9:559-562
- El-Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, Lopez-Aranda JM, Pliego F, Quesada MA (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca*. Plant Cell Rep 15:642-646
- Fillatti JJ, Kiser J, Rose R, Comai L (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. BioTechnology 5:726-730
- Gaffer J, Tiznado ME, Handa AK (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. Plant Phys 114:1547-1556
- Goff SA, Klein TM, Roth BA, Fromm ME, Cone KC, Radicella JP, Chandler VL (1990) Transactivation of anthocyanins biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes in maize tissue. EMBO J 9:2517-2522
- Öktem HA, Mahmoudian M, Eyidofan F, Yücel M (1999) Gus gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment, Lens Newsllett 26:3-6
- Hamza S, Chupeau Y (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). J Exp Bot 44:1837-1845
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann N, Wallroth M, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes to plants. Science 227:1229-1231
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 33:105-119
- Öktem HA, Bülbül Y, Öktem E, Yücel M (1999) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation studies in tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller). Turkish J Botany 23:345-348
- Ichimura K, Oda M (1995) Stimulation of root growth of lettuce by agar and its extract. Acta Hort (ISHS) 393:127-134
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion : fl glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901-3907
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevaldo J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol 128:751-759
- Lee KS, Schottler F, Collins JL, Lanzino G, Couture D, Rao A, Hiramatsu KI, Goto Y, Hong S-C, Caner H, Yamamoto H, Chen Z-F, Bertram E, Berr S, Omary R, Scrabble H, Jackson T, Goble J, Eisenman L (1997) A genetic animal model of human neocortical heterotopia associated with seizures. J Neurosci 17:6236-6242
- Ling HQ, Kriseleit D, Ganai MW (1998) Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Rep 17:843-847
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry B, Barnason A, Horsch R, Farley R (1986) Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep 5:81-84
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Myers KA, Lambe K, Aldridge TC, Macdonald N, Tugwood JD (1997) Amino acids in both the DNA binding and ligand binding domains influence the transcriptional activity of the human peroxisome proliferator activated receptor alpha. Biomed Biophys Res Commun 239:522-526
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG (2001) Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96:925-926
- Potrykus I (1991) Gene transfer to plants : assessment of published approaches and results. Annu Rev Plant Physiol 42:205-225
- Potrykus I, Spangenberg G (eds) (1995) Gene transfer to plants. Berlin : Springer, 361 p
- Pozueta-Romero J, Houlne G, Canas L, Schantz R, Chamarro J (2001) Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant cell tissue organ cult 67(2):173-180
- Raj SK, Rachana S, Pandey SK, Singh BP (2005) *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. Curr Sci 88:10-25
- Sachs T, Thimann KV (1967) The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. Am J Bot 54:136-144
- Sanford J, Smith F, Russell A (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol 217:483-509
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11:118-131
- vanRoekel JSC, Damm B, Melchers LS, Hoekema A (1993) Factors influencing transformation frequency of tomato. Plant Cell Rep 12:644-647
- Yuan J, Henry R, McCaffery M, Cline L (1994) SecA homologue in protein transport within chloroplasts : evidence for endosymbiont-derived sorting. Science 266:796-798
- Zhong S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen MB (1996) Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*Bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.). Theor Appl Genet 92:752-761

Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Nahed Abdel Ghaffar Abdel Aziz Ibrahim¹, Sanaa Osman Abdallah², Mohamed Sayed Salama³ and Magdy Ahmed Madkour¹

Abstract

This work has been carried out in order to construct a potent *Bacillus thuringiensis* (Bt) strain active against the Egyptian cotton leaf worm *S. littoralis*. Toward this target, the δ -endotoxin crystal protein genes *cry1C* (that encodes an insecticidal protein highly specific to *S. littoralis*) and *cry1Ag* (1Ac like) were used. *Hind*III digested *cry1C* was ligated into the *Hind*III site of the shuttle vector pHT7593 yielding the plasmid pHTNC3. *Hinc*II digested *cry1Ag* was ligated into *Sma*I site of pHT7593 and into *Sma*I site of pHTNC3. The three plasmid constructs were used to transform *E. coli* strain JM109. Colonies likely to contain these recombinant plasmids were screened for the production of toxin proteins. Positively identified transformants produced the expected size protein, detected by partial purification of protein, and is truncated upon trypsin digestion.

The pHT7593-bearing *cry1C*, pHT7593-bearing *cry1Ag* and pHTNC3-harboring-*cry1Ag* were transferred into the non-crystalliferous (Cry⁻) Bt4 Bt strain. The introduction of the *cry1Ag* gene into Cry⁻ Bt4 resulted in the formation of bipyramidal crystals. The introduction of both *cry* genes 1C and 1Ag resulted in the multiplication of bipyramidal crystals. In bioassays, *cry1Ag*-expressing BT4 Bt strain caused mortality of *S. littoralis* larvae only slightly (the LC₅₀ was 104 ppm). In the presence of only Cry1C, the LC₅₀ was 64 ppm. In presence of Cry1C co-expressed with Cry1Ag the LC₅₀ decreased to 2.2 ppm. Thus, a combination of the Cry proteins 1C and 1Ag could result in effective insect control. With this approach, a combination of Cry proteins can be designed rather than discovered.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry 1C* gene, *Cry 1C* toxin protein, cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*, transformation of Bt

Zusammenfassung

Herstellung eines Stammes von *Bacillus thuringiensis* wirksam gegen *Spodoptera littoralis*

Zur Reduzierung des Aufwandes an Pestiziden im Baumwollanbau könnte die Herstellung virulenter Bakterienstämme gegen Insekten ein wirksames Mittel sein. Die Arbeit beschreibt die genetische Modifikation von *Bacillus thuringiensis* durch Implementierung des δ -endotoxin Protein Gens *cry1C*. Das modifizierte Bakterium zeigt Wirksamkeit gegenüber *Spodoptera littoralis*.

Schlüsselwörter: *Bazillus Thuringiensis*, *cry1C*, *Spodoptera littoralis*, Transformation von Bt

¹ Agricultural Genetic Engineering Research Institute, ARC, Giza/Egypt; Email: nahed_ibrahim@excite.com

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Cairo University, Cairo/Egypt

³ Department of Entomology, Faculty of Science, Ain Shams University, Cairo/Egypt

1 Introduction

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a ubiquitous gram-positive, spore-forming bacterium that forms a parasporal crystal during the stationary phase of its growth cycle. *Bt* was initially characterized as an insect pathogen and its insecticidal activity was attributed largely or completely to the parasporal crystals and also to the vegetative insecticidal proteins (Vip) that *Bt* produce it during its vegetative growth stage (Fang et al., 2007). This character led to the development of bioinsecticides based on *Bt* for the control of certain insect species among the orders Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera and other insect orders (Hymenoptera, Orthoptera and Mallophage), and against Nematodes, Mites, and Protozoa (Feitelson, 1993; Feitelson et al., 1992). *Bt* seems to be indigenous to many environments (Bernhard et al., 1997). Strains have been isolated worldwide from many habitats, including soils (Delucca et al., 1977), insects (Carozzi et al., 1991), stored-product dust (Burgess and Hurst, 1997), and deciduous and coniferous leaves (Kaelin et al., 1994).

Bt is now the most widely used biologically produced pest control agent and the foliar sprays from it plays a role in the integrated pest management strategies (Crickmore, 2006). Although the use of synthetic chemical pesticides in agriculture still in the front of that of biological pesticides, but several environmental and safety considerations favor the future development of *Bt* Cry proteins that have been studied thus far are not pathogenic to mammals, birds, amphibians or reptiles but are very specific to the groups of insects and invertebrate pests against which they have activity. Cry-based pesticides generally have low costs for development and registration. Finally the mode of action for the Cry proteins differs completely from the modes of action of known synthetic chemical pesticides, making Cry proteins key components of integrated pest management strategies aimed at preserving natural enemies of pests and managing insect resistance. Natural isolates of *Bt* can produce several different crystal proteins, each of which may exhibit different target specificity (Hofte and Whiteley, 1989; Lambert and Peferoen, 1992). Certain combinations of Cry proteins have been shown to exhibit synergistic effects (Chang et al., 1993; Crickmore et al., 1995; Lee et al., 1996; Poncet et al., 1995; Wu et al., 1994).

According genetic manipulation of *Bt* to create combination of genes more useful for a given purpose than those known to occur in natural isolates. Engineering of *Bt* and *B. cereus* through electroporation technology to transform vegetative cells with plasmid DNA has been done (Belliveau and Trevors, 1989; Bone and Ellar, 1989; Lereclus et al., 1989; Mahillon et al., 1989; Masson et al., 1989; Schuter et al., 1989). These protocols differed in cell preparation methods, buffer components and elec-

tric pulse parameters. A wide variety of hosts and vectors was used, a variety of shuttle vectors, some employing *Bt* plasmid replicons (Arantes and Lereclus, 1991; Baum et al., 1990; Chak et al., 1994; Gamel and Piot, 1992) has been used to introduce cloned *cry* genes into *Bt* (Burke and Baum, 1991). Alternatively, integrational vectors have been used to insert *cry* genes by homologous recombination into resident plasmids (Adams et al., 1994; Lereclus et al., 1992) or the chromosome. Plasmid vector systems employing *Bt* site-specific recombination system have been developed to construct recombination *Bt* strains for new bioinsecticide products (Baum et al., 1996; Sanchis et al., 1996; Sanchis et al 1997).

Bt Cry IC δ -endotoxin is a lepidopteran-specific insecticidal protein with a toxic spectrum different from Cry IA δ -endotoxins, *Bt* toxine nomenclature, 2006, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/neil_crickmore/Bt/. Cry IC has high activity against *Spodoptera* species, which are relatively resistant to Cry IA toxins. Cry IC remains active against several insect species that have acquired resistance to Cry IA toxins (Ferre et al., 1991; Tabashnik et al., 1994). Cry IC is released from *Bt* crystals as a 135 KDa protoxin and cleaved to a 62 KDa toxin in the alkaline insect midgut. Cry IC and Cry IA toxins recognize different sites in the larval midgut (Van Rie et al., 1990; Escriche et al., 1994). From literatures Cry IC and Cry IAc binding sites are functionally distinct. Cry IAc resistant insect species (*Plod interpunctella* and *Plutella xylostella*) still bind and are killed by Cry IC toxin (Luo et al., 1996).

Spodoptera littoralis is a polyphagous insect, which is one of the major pests of cotton and other crops in Egypt and the Near East. This insect acquired resistance to several chemical insecticides, thus favoring the use of biological control. Many *Bacillus thuringiensis* strains possess insecticidal properties against different lepidopterous larvae. Several commercial preparations of *Bt*, mainly of serovars thuringiensis and kurstaki, are presently being employed throughout the world. However, these formulations have not yet succeeded to give good control of *S. littoralis* (Kalfon and De Barjac, 1985). In This study, we were interested in placing *cry1C* gene which encodes Cry1C protein, with other lepidopteran active gene into *Bt* strain to enhance the activity of *cry1C* against the cotton leaf worm *S. littoralis*. Moreover, the simultaneous production of two crystal proteins that act independently on the same insect, perhaps through the recognition of different receptors of larval midgut epithelial cells, might prevent or at least delay the appearance of insensitive insect population. To this end, construction of a *Bt* strain contained *cry1C* gene with other gene to enhance the toxicity and to be a potent *Bt* strain against the Egyptian cotton leaf worm *S. littoralis* was an aim.

2 Materials and methods

Bacterial strains and plasmids that were used in this work are illustrated in the Tables 1 and 2.

Table 1:

Bacterial strains used in this study

Bacterial strain	Description	Source
<i>E. coli strains</i> JM109		Contained in PGEM-T Easy vector system II kit. (Promega)
<i>Bt strains</i> <i>Kurstaki HD-73</i>	Cry1Ac	Pasteur institute, France
<i>Entomocidus 60.5</i>	Cry1C	
Bt4	Crystal negative	MMB lab, AGERI, Egypt
BtN1C	Cry1C	This study
BtNAg	Cry1Ag	This study
BtN1CAg	Cry1C/cry1Ag	This study
Transformed HD73	Cry1Ac/cry1C	This study

Table 2:

Plasmids used in this study

Plasmid	Vector/toxin gene	Promoter from which toxin gene was transcribed	Source	Accession No.
Cry1C	pTZ19R/1Cb	Cry1C	D.H.Dean, O.S.U	M97880
Cry1Ac	PKK223-3/1Ac	Cry1Ac	D.H.Dean, O.S.U	
Cry1Ag	pUC/1Ag	Cry1Ag	S.A.Mostafa, MMB lab, AGERI	AF081248
pHTNC3	pHT7593/cry1C	Cry1C	This study	
pHTNAg	pHT7593/cry1Ag	Cry1Ag	This study	
pHTN1CAg	pHT7593/cry1C & cry1Ag	Cry1C/ cry1Ag	This study	

Construction of plasmids

The cry1C gene was generously obtained from Dr. Donald H. Dean's lab, Ohaio State University, USA; cloned into *Hind*III site of pTZ19-R. Cry1C in pTZ19-R plasmid was digested with *Hind*III to liberate the *Hind*III fragment that contains the coding region of cry1C gene with its regulatory region; at the same time the shuttle vector pHT7593 was digested with *Hind*III. The purified DNA corresponding to the cry1C gene and the vector were mixed in a 3:1 (insert: vector) molar ratio and ligated using T4 DNA ligase and transformed into *E. coli* cells JM109. Transformed colonies were screened by the rapid phenol/chloroform method (to an O/N 100 µl liquid culture of transformed colony, 50 µl phenol/chloroform and 10 µl loading day were added and then vortexed for 10 sec and spun for 3 min

at 10,000 rpm). The same sequence of methods was used when the other 2 plasmids were constructed. The cry1Ag gene was obtained from Dr. Salah Mostafa, Microbial Molecular Biology lab (MMB), Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), Giza, Egypt; cloned into pUC 18 vector. It was liberated by digestion of pUC 18/cry1Ag plasmid with *Hinc*II. The *Hinc*II fragment that coding for cry1Ag with its regulatory region was ligated with *Sma*I digested pHT 7593 vector. The third plasmid was constructed from the digestion of the 1st construct (cry1C in pHT 7593 shuttle vector) with *Sma*I and then mixed with the *Hinc*II fragment coding for cry1Ag gene and ligated together (Figure 1). The list of plasmids used is shown in (Table 1).

Transformation of Bt

Bt cells were transformed by electroporation as described by (Chang et al., 1992; Lecadet et al., 1992; Mettus and Macaluso, 1990 and Luchansky et al., 1988). 500 ng of the plasmid DNA, that derived from the recombinant *Bt* cells were added to 0.8 ml of *Bt* competent cells and placed in sterile, pre chilled electroporation cuvettes (0.4 cm interelectrode gap) and hold on ice for 5 min. Electroporation was carried out with a Bio-rad Gene pulser at a field strength 2.5 KV, resistance 150 Ω (Ohms) and capacitance 25 µf. The electroporated cells were added to 1.5 ml of LB medium, incubated for 1 h at 37 °C, plated on LB medium containing 100 µg/ml kanamycin and then incubated at 30 °C for 24 to 48 h. Kanamycin resistant (Kan^r) transformants were analyzed for the presence of the transformed plasmids.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR has been used to screen the transformed *E. coli* cells and the electroporated *Bt* clones for the presence of cry1C and cry1Ag, the lipedopteran toxin genes. The list of primers used is shown in (Table 3). The reaction conditions were performed according (Regev et al., 1996), where the PCR mixture was in a total volume of 25 µl contained 1 µg of total DNA, 50 pmol of each primer, 0.2 mM deoxy nucleoside triphosphates, 2.5 µl of the Taq polymerase enzyme, 2.5 µl of 10 X enzyme buffer and 2.5 µl Mg Cl₂. The amplification reaction was carried out using 35 cycles of 94 °C (45 sec), 48 °C (45 sec) and 72 °C (120 sec) and then a 7- min termination at 72 °C.

Expression of cry toxin genes in transformed cells

A total cellular protein of transformed *E. coli* cells/sporulated bacterial cells from the transformed *Bt* and the parent bacterial isolates were prepared. The bacterial cells from the transformed *Bt* were grown on T3 medium for 72 h in incubator shaker at 30 °C. SDS-PAGE was carried out as described by Laemmli, (1970). The transformed

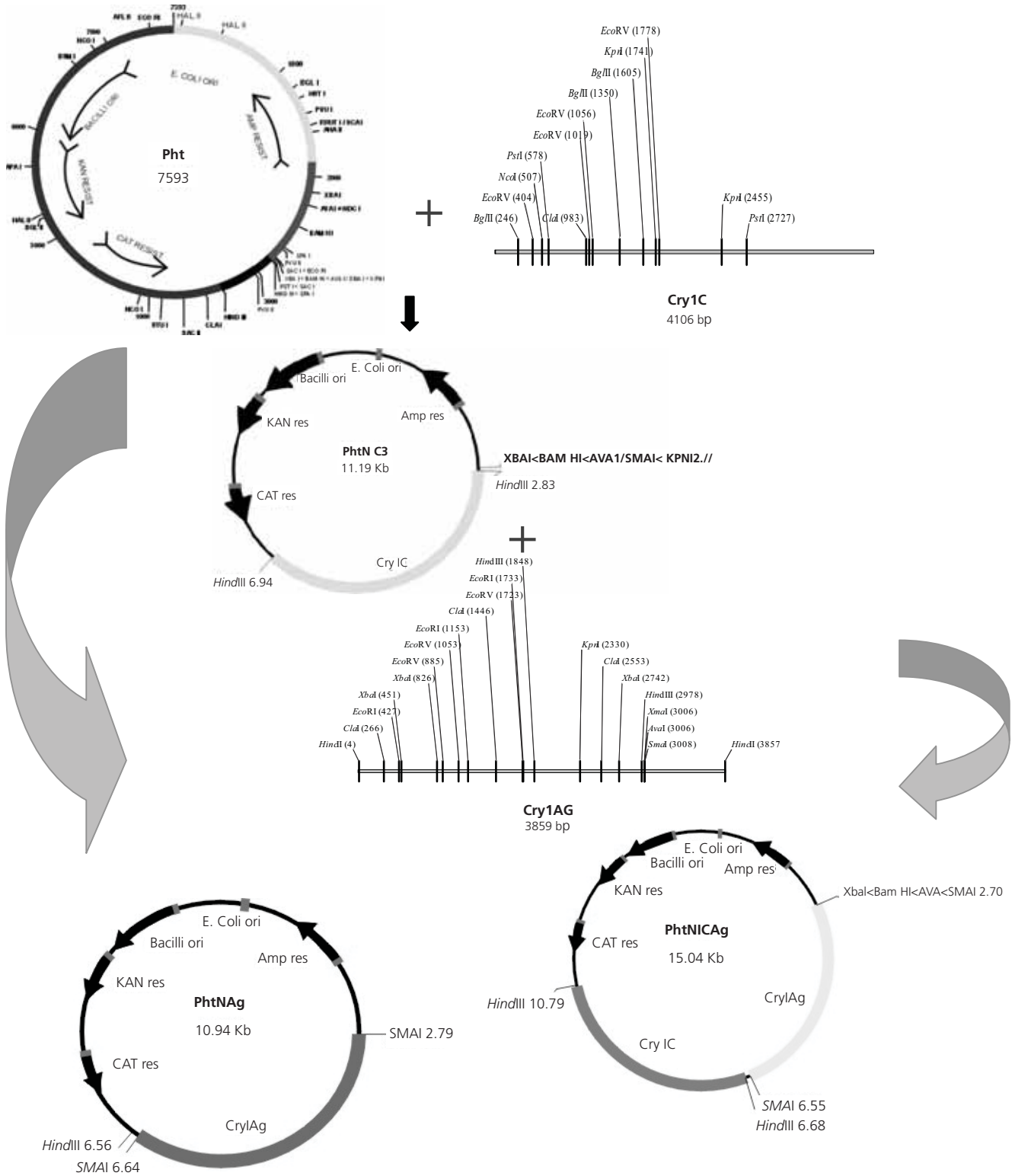


Figure 1:

Cry1C *Hind*III digested was cloned into the *Hind*III site of pHT7593 vector.

A *HincII* fragment carrying the full-length *cry1Ag* gene was ligated to *SmaI* digested pHT7593. Additionally, *HincII*-digested *cry1Ag* was ligated to *SmaI*-digested pHTNC3.

Table 3:

Primers used in the PCR reactions

Primer Pairs	Gene recognised	PCR expected product size in (bp)	Sequence of primers	Reference
Lep1A Lep1B	Cry1A (Cry1AC)	490	CCGGTGCTGGATTGTGTTA AATCCCGTATTGTACCAGCG	Carozzi et al., 1991
Lep2A Lep2B		908	CCGAGAAAGTCAAACATGCG TACATGCCCTTTCACGTTC	
IAF IAR	Cry1C	2247	ACGGAGGATCCATATGGAGG AAAATAATCAAAATC CTCTTGGATCCTAACGGGT ATAAGCTTTTAATTC	Ragev et al., 1996
IAF ICR	Cry1C	3600	ACGGAGGATCCATATGGAGG AAAATAATCAAAATC TTATTCCTCCATAAGGAGTAAT TCC	This study
IACF IACR	Cry1Ac	2000	ATGGATAACAATCCGAACATC AAGTAAATCCGCTCATCACT	This study

cells were collected by centrifugation and treated with sample buffer that composed of (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (W/V) SDS, 2 % (V/V) 2-mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol and 0.0025 % (w/v) bromophenol blue) and boiled at 100 °C for 5 min. Samples were applied to a 10 % polyacrylamid gels and run at 200 V for 45 min at room temperature in mini protein Biorad cell. Protein bands on gels were visualized with coomassie brilliant blue R-250.

Purification of the expressed crystal δ -endotoxins

The various transformed *Bt* strains were grown in liquid T3 sporulation medium. Mixture of spore-crystal was harvested by centrifugation and the spore-crystal pellet was washed 6 times with deionized distilled ice-cold water containing 5 mM EDTA to get rid of sporangial debris. The cleaned pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7.5. Spores and crystals were separated using differential ultra centrifugation through a discontinuous sucrose density gradient of 55 %, 70 %, and 87 % W/V sucrose in 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/10 mM KCl. The purified crystal protein was solubilized in pH 9.5 buffer of (50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃) and 10 mM dithiothreitol at 37 °C for 4 h (Lu et al., 1994). The solubilized proteins were separated by centrifugation and dialyzed against ammonium bicarbonate buffer pH 8.3 and subjected to trypsinization (Lilly et al., 1980).

Western blot immunoassay

The presence of Cry1C, 1Ag and 1C-1Ag delta-endotoxins were detected in crude extracts of transformed cells by a western blot (immunoblot) analysis (Lampel et al., 1994). Total cellular proteins were prepared and solubi-

lized by boiling in sample buffer and separated by electrophoresis on 10 % polyacrylamid gels. The gels were electrophoretically blotted onto pre wet PVDF membrane. The membranes were blocked in blocking buffer containing 1 % bovine serum albumin (BSA), then membranes were incubated in blocking buffer contained the toxins for 2 h. Anti-truncated 65 kDa from *Bt kur*- HD-1 serum (1-1000 dilution) was used as primary antibody and was incubated with membranes in the blocking buffer O/N at 4 °C. The membranes were incubated with alkaline phosphates conjugated secondary antibody (1-1000 dilution). CDP-chemiluminescent substrate was used and the emitted light was captured on X-ray film.

Insect Bioassay

Bacterial isolates were grown until sporulation in liquid T3 media for 72 h. Cultures were centrifuged and the pellets were washed once with Tris-HCl pH 8.00 containing 1 M NaCl, and lyophilized. The dried cells were used directly for bioassay. A stock concentration of 1000 ppm was made by dissolving 1 gm of lyophilized cells in 1000 ml H₂O (Dulmage, 1971). Different concentrations of 500, 250, 100, 50, 25, 15, 10, 5, 1, 0.5 and 0.2 ppm, were prepared and added to the surface of solidified artificial medium (dry powdered Lima beans 150 gm, dry yeast 15 gm, ascorbic acid 3 gm, Nipagin 3 gm, agar-agar 6 gm and 600 ml dd H₂O) (Loutfy, 1973) and kept for 2 h at room temperature. Ten neonate larvae of *Spodoptera littoralis* were added to each cup, the mortality was recorded every 24 h until 72 h.

3 Results

The constructed plasmids were transformed first into *E. coli* JM109 bacterial cells to test the expression of the plasmids. The transformed clones were screened and selected primarily according to their growth on ampicillin (100 mg/ml) plates after 18 h. The selected clones were tested for the presence of plasmids that contained the toxin genes and then by PCR.

PCR

The two sets of primers IAF & IAR and IAF & ICR specific for cry1C, were used with several recombinant clones and gave the ~ 2.2 kb and ~ 3.7 kb expected PCR products, respectively. From that clones; one clone (clone 3) was selected and its amplified PCR products were electrophoresed on agarose gel electrophoresis (Figure 2A). The results obtained from the gel revealed that clone 3 was contained cry1C gene. The two specific primers IACF and IACR were used to detect the cry1Ag. The data in (Figure 2B) showed the expected 2 kb PCR product amplified from clones 9 & 10 and from the positive control cry

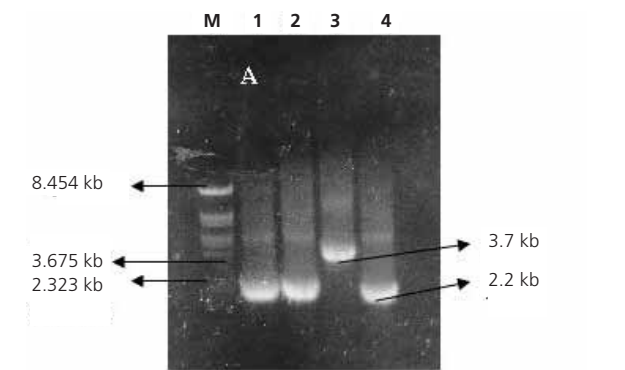


Figure 2A:
Gel electrophoresis for amplified PCR products from DNA of recombinant clone 3 compared with that from DNA of the original plasmid pTZ19-R/cry1C (*cry1C* specific primers were used).
M: Lambda *Bst*E II DNA marker, Lanes 1 & 2: pTZ19-R/*cry1C* plasmid with IAF & IAR, Lane 3: clone 3 with IAF & ICR, Lane 4: clone 3 with IAF & IAR.

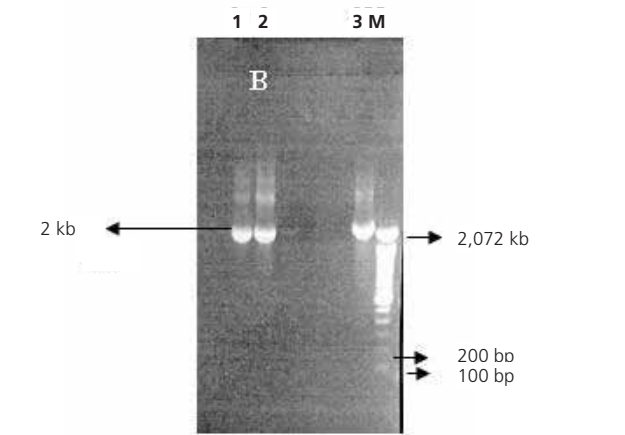


Figure 2B:
Agarose gel electrophoresis for PCR amplified products from clone 10 compared with pUC 18/*cry1Ag* plasmid, the primer set used was, IACF and IACR. Lanes 1 & 2: clones 9 & 10, Lane 3: pUC 18/*cry1Ag* plasmid, M: 100 bp ladder DNA marker (2,072, 1,500, 600, 200, and 100 bp are the main bands).

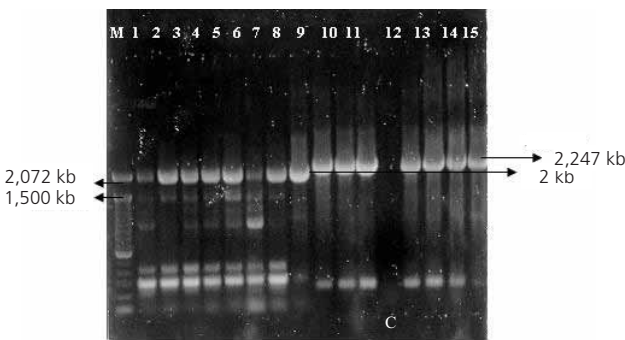
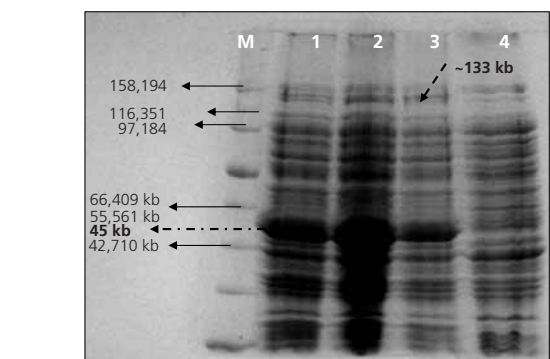


Figure 2C:
Gel electrophoresis for PCR amplified products from clone 12 compared with clone 3 and pUC 18/*cry1Ag*. The primer sets used were: IAF & IAR that give 2,247 kb PCR product with *cry1C* and IACF & IACR that give 2 kb PCR products with *cry1Ag*.
M: 100 bp DNA ladder marker, Lanes 1 to 6: are clones 1, 2, 3, 30, 31 and 40 with primer set IACF & IACR, Lane 7: clone 12 with primer set IACF & IACR, Lane 8: pUC 18/*cry1Ag* plasmid with primer set IACF & IACR, Lanes 9 to 13: are clones 2, 3, 30, 31 and 40 with primer set IAF & IAR, Lane 14: clone 12 with primer set IAF & IAR, Lane 15: clone 3 with primer set IAF & IAR.



← - - - This pointer refer to the expressed toxin protein ~ 133 kd
← - - - This arrow refer to the expressed protein from the pHT vector

Figure 3:
Expression of *cry1C*, *cry1Ag*, and *cry1C/cry1Ag* genes in *E. coli* strain JM109. A coomassie-stained SDS-polyacrylamide gel showing the expressed ~ 133 kd toxin protein.
M: Protein marker, broad range (212, 158.19, 116.35, 97.18, 66.40, 55.56, 42.71, and 36.48 kd are the main bands), Lane 1: clone 3 expressing *Cry1C* toxin protein, Lane 2: clone 10 expressing *Cry1Ag* toxin protein, Lane 3: clone 12 expressing *Cry1C/Cry1Ag* toxin protein, Lane 4: non transformed JM109 *E. coli* strain that lacks the ~ 133 kd and the ~ 45 kd.

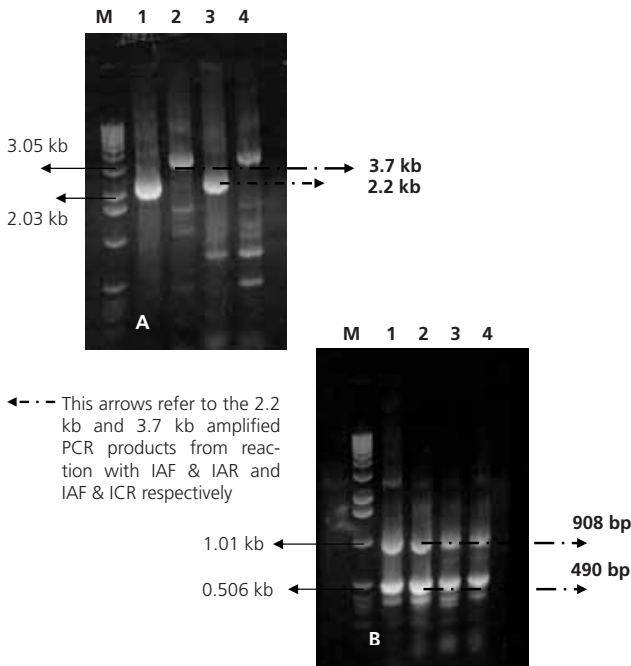


Figure 4:
A:
Agarose gel electrophoresis for amplified PCR products from DNA of transformed *Bt* strains (Bt4 and HD73) with the recombinant plasmid pHTNC3. M:1 kb ladder DNA marker (12.2, 11.19, 10.18, 9.16, 8.14, 7.12, 6.1, 5.09, 4.07, 3.05, 2.03, 1.63, 1.01, 0.506, and 0.396 kb are the M.wt(s) of its bands), lane 1: transformed Bt4 with *cry1C* with IAF & IAR, lane 2: transformed Bt4 with *cry1C* with IAF & ICR, lane3: transformed HD73 with *cry1C* with IAF & IAR, lane 4: transformed HD73 with *cry1C* with IAF & ICR.
B:
Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from transformed *Bt* strains that harboring pHTNC3, pHTNag, pHTN1Cag, and transformed HD73 with pHTNC3 with primers specific for *cry1*-type toxin genes (Lep1A, Lep1B, Lep2A, and Lep2B).
M: 1 kb ladder DNA marker, lane 1: transformed *Bt* harboring pHTNC3, lane 2: transformed *Bt* harboring pHTNag, lane 3: transformed *Bt* harboring pHTN1Cag, lane 4: transformed HD73 harboring pHTNC3.

1Ag plasmid revealing that clones 9 & 10 contained the recombinant plasmid that harbors *cry1Ag*. The two specific set of primers IACF & IACR and IAF & IAR were also used to detect both the *cry1Ag* and *cry1C* in the recombinant clones that were transformed with the 3rd construct. The data in (Figure 2C) showed the expected PCR products, 2 kb and 2.2 kb, indicating the presence of *cry1Ag* and *cry1C* genes in its transformed cells. From 7 clones, clone 12 was selected to complete the work on it.

Protein expression

Cellular proteins from the recombinant clone 3, clone 10, and clone 12 were analyzed on SDS-polyacrylamid gel electrophoresis (Figure 3). The data on the gel revealed the expression of the ~ 133 kd of toxin protein of Cry1C, Cry1Ag, and Cry1C/Cry1Ag respectively. The results were compared to the protein pattern from *E. coli* free (non-transformed) which didn't show the 133 kd protein. The three clones showed a protein band at ~ 45 kd that did not appear with the protein from the non-transformed *E. coli*. This data confirmed the expression of the recombinant plasmids in the transformed *E. coli* cells.

Electrontransformation

The three prepared plasmids, pHTNC3 (harboring *cry1C* gene), pHTNAg (harboring *cry1Ag*) and pHTN1CAg (harboring both *cry1C* and *cry1Ag*) were electroporated separately into the Cry negative (Cry⁻) *Bt* local strain Bt4. The transformed cells were selected primarily according to their growth on 100 µg/ml kanamycin plates and they were subjected to screening via PCR using the same specific primers that were used with transformed *E. coli* JM109 cells. Additionally, the set of primer pairs Lep1A & 1B and Lep2A & 2B that are specific for *cry1A* were used for detection of *cry1Ag*. The results of PCR revealed the presence of the toxin genes in the different transformed *Bt* cells (Figure 4A and 4B).

Protein expression in Bt bacterial cells

Total cellular proteins of the sporulated cells of transformed *Bt* isolates were fractionated on denaturing gels by SDS-PAGE. The protein banding pattern of the transformed *Bt* were compared to the protein banding pattern of the parent *Bt* strain Bt4 (Figure 5). Examination of the protein pattern showed the highly expressed protein at ~ 133 kd and this 133 kd protein did not appear in the parent strain Bt4, revealing the high expression of the *cry1C*, *cry1Ag*, and *cry1C/cry1Ag* genes in the recombinant plasmids pHTNC3, pHTNAg, and pHTN1CAg respectively that were transformed into the acrySTALLIFEROUS (Cry⁻) *Bt* strain Bt4. The data also showed that the Bt4 parent strain was not able to show any insecticidal crystal protein (ICP), revealing that it did not contain any *cry* genes. A protein band at

~ 45 kd appeared with all the transformed *Bt* strains but did not appear neither with the protein of the parent strain Bt4 nor with the positive control *kur* HD73 *Bt* strain that naturally contains *cry1Ac*, revealing that this protein may be resulted from the expression of the pH7 7593 vector.

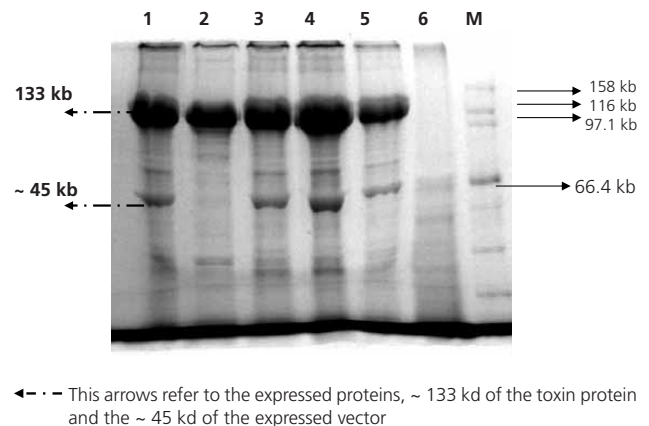


Figure 5:

SDS-PAGE (polyacrylamid gel electrophoresis) of the transformed *Bt* strains expressing the toxin protein Cry1C, Cry1Ag, and Cry1C/Cry1Ag. Lane 1: transformed HD73, lane 2: *kur*-HD73 *Bt* strain, lane 3: transformed Bt4 with pHTN1CAg plasmid, lane 4: transformed Bt4 with pHTN1Ag plasmid, lane 5: transformed Bt4 with pHTNC3 plasmid, lane 6: Bt4 strain, M: protein marker, broad range (2 - 212 Kd).

Crystal purification, solubilization and trypsinization

The crystals produced by the transformed Bt4 *Bt* cells were purified on sucrose gradients, solubilized in a buffer of pH 9.5 and trypsinized with pure trypsin. The molecular masses of the crystal proteins and the activated toxins were analyzed by SDS-PAGE. Figure 6 shows the purified and solubilized protoxins (at ~133 kd) banding pattern

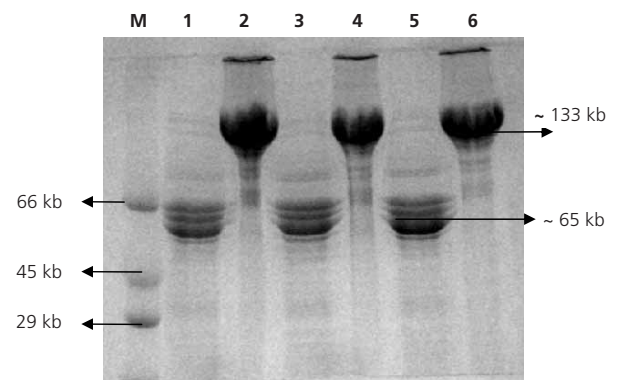


Figure 6:

Protein analysis of crystals synthesized by the transformed *Bt* strains harboring *cry1C*, *cry1Ag* and *cry1C/cry1Ag*. M: Low range molecular protein marker, lane 1: activated toxin of Cry1C/Cry1Ag, lane 2: protoxin of Cry1C/Cry1Ag, lane 3: activated toxin of Cry1Ag, lane 4: protoxin of Cry1Ag, lane 5: activated toxin of Cry1C, lane 6: protoxin of Cry1C.

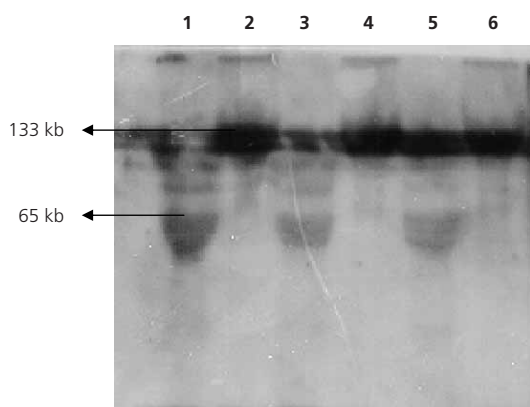


Figure 7:

Immunodetection of crystal proteins in transformed *Bt*
 Lanes 1 & 2: active toxin and protoxin from *Bt* transformed with *cry1C/cry1Ag*
 Lanes 3 & 4: active toxin and protoxin from *Bt* transformed with *cry1Ag*
 Lanes 5 & 6: active toxin and protoxin from *Bt* transformed with *cry1C*.

simultaneously with its activated toxin (trypsinized protoxin) at ~ 65 kd from the transformed Bt4 with pHTNC3, pHTNAG, and pHTN1CAG respectively. The data obtained on the gel (Figure 6) revealed the high expression of the Cry toxins that were transferred into the *Bt* strains cloned in the pHT vector indicating; the high stability of that vector in *Bt* strains.

Western immunoblotting

Antibody-antigen immunoreaction was detected between anti-60 kd toxin antiserum and antigen expressed by the *Bt* transformed with pHTNC3, pHTNAG, and pHTN1CAG (Figure 7). The data revealed that the recombinant proteins from all the transformed *Bt* strains gave sharp bands where the homologous antiserum reacted strongly to its respective homologous toxin protein, and the resulted bands of the protoxin were at the expected molecular masses of protoxin protein ~133 Kd and that of the activated protein were at the expected kd of the activated toxin ~ 65 kd.

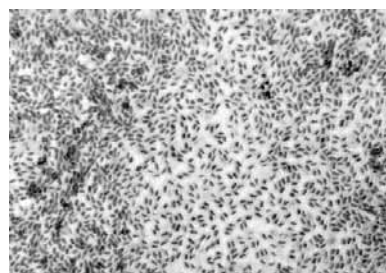


Figure 8:

The microscopic examination of sporulating cells of *Bt* Bt4 strain. Bt4 has been grown on T3 sporulation media for more than five days at 28 - 30 °C, cells tended to give spores but not crystals.

Microscopic examination of spore-crystal stained smears from parent strain, Bt4 compared to the transformed strains were illustrated. Figure 8 showed the spores from sporulating cells of *Bt* Bt4, which gave no crystals when grown on T3 sporulation media at 28 - 30 °C for 3 - 7 days. Figure 9A, 9B and 9C showed the bipyramidal crystals in the transformed Bt4 with pHTNC3, pHTNAG, and pHTN1CAG respectively. The three transformed *Bt* strains were grown on T3 sporulating media at 28 - 30 °C for 3 days. The data revealed and confirmed all the previous experiments (in this study) that the different *cry* genes (*cry1C*, *cry1Ag*, and *cry1C/cry1Ag*) cloned into the pHT7593 vector were expressed in the native host bacteria *Bt*.

Bioassay

The spore-crystal complexes from transformed *Bt* strains were examined for their toxicity against lepidopteran insects. In this assays, Bt4 transformed with pHTNC3, pHTNAG, and pHTN1CAG were used against the larvae of *S. littoralis*. The toxicity of the transformed Bt4 isolates was compared to that of the parent strain Bt4 (the spores of Bt4 were used in this assays) (Figure 10). Table 4 shows the LC₅₀ values from the different toxins used in these assays against the cotton leaf worm *S. littoralis*. The bioassay of dried-pellet culture from up to 2000 ppm of Bt4, did not

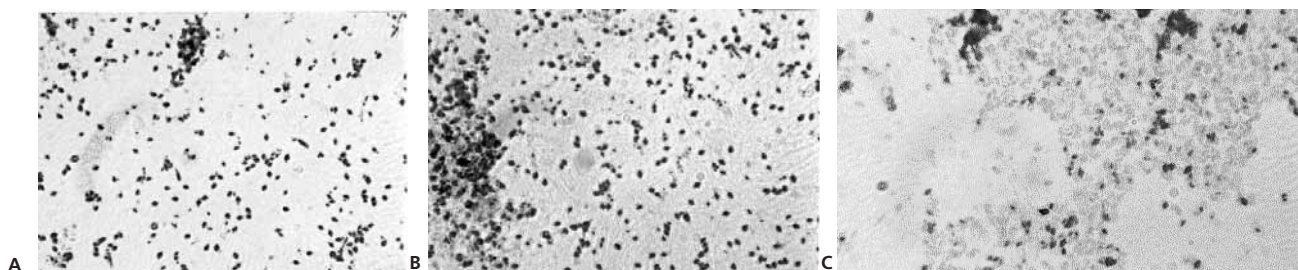


Figure 9:

A: The microscopic examination of sporulating cells from the constructed *Bt* that harboring *cry1C* gene. He figure shows the bipyramidal crystals as a result of expression of Cry1C toxin protein.
 B: The microscopic examination of sporulating cells from the constructed *Bt* that harboring *cry1Ag* gene. The figure shows the bipyramidal crystals as a result of expression of Cry1Ag toxin protein.
 C: The microscopic examination of sporulating cells from the constructed *Bt* that harboring *cry1C/cry1Ag* genes. The figure shows the bipyramidal crystals as a result of expression of Cry1Ag/Cry1C toxin proteins.

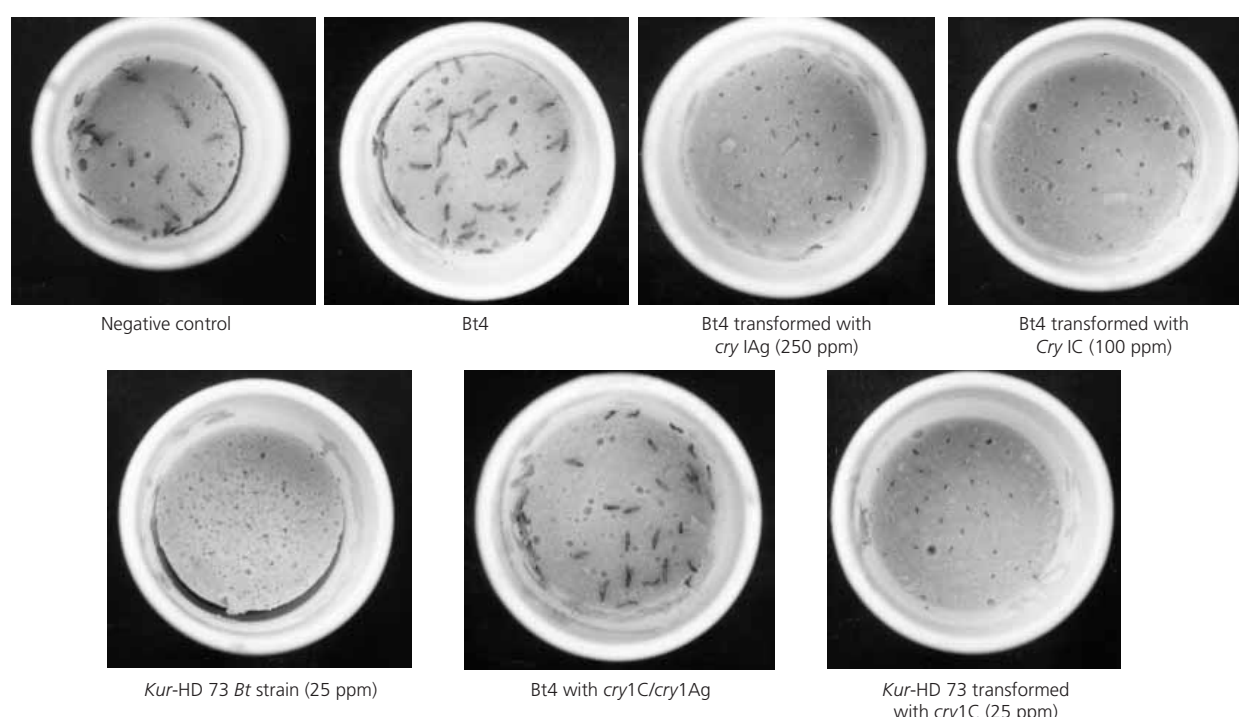


Figure 10:

The effect of toxicity of *Bt* Bt4 Cry- and Bt4 transformed with *cry1C*, *cry1Ag* and *cry1C/1Ag* on larvae of *S. littoralis* compared with the effect of *Bt* strain *kur*-HD73 and its transformed one (*kur*-HD73 harboring *cry1C*).

Table 4:

The LC₅₀ values in ppm of toxins and combination of toxins used against the cotton leaf worm *S. littoralis*

Strain/toxin	LC ₅₀ (ppm)	95 % confidential limits	Slope/SE
<i>Kur</i> -HD73 Cry1Ac	197.42	(150.42 - 321)	1.79 ± 0.36
<i>Bt</i> /NC3 Cry1C	63.23	(221.15 - 22.07)	1.67 ± 0.391
<i>Bt</i> /NAg Cry1Ag	103.69	(122.71 - 87.71)	2.94 ± 0.40
<i>Bt</i> /N1C1Ag Cry1C & Cry1Ag	2.216	not determined	0.87 ± 0.38
<i>Entomocidus</i> Cry1C	41.48	not determined	3.9 ± 1.016
Transformed-HD73 Cry1C & Cry1Ac	6.65	not determined	1.89 ± 1.059
Mixture of HD73 & <i>entomocidus</i>	31.32	(33.49 - 29.23)	9.13 ± 0.926
Mixture of <i>Bt</i> /N1Ag & <i>Bt</i> /N1C	6.6	not determined	1.89 ± 1.059

^a Bioassays were performed on spore-crystal preparations from T₃ liquid cultures

^b LC₅₀ is a concentration of toxin required to kill 50 % of 1st instar larvae

^c LC₅₀s were calculated by probit analysis

^d Probit model is $Y = a + b \cdot x$

where Y = probit value

a = intercept, probit value for x = 0

b = slope, regression coefficient of y on x

x = log (dose)

^eSE is the standard error

show any toxicity against *S. littoralis* (Figure 10) revealing that the parent strain Bt4 does not express or may be not contain any *cry* genes. On the other hand the bioassay of transformed Bt4 with *cry1C* (Figure 10) showed high specificity against *S. littoralis* comparable to that from *entomocidus* Bt strain that were used as positive control which naturally contains only the delta-endotoxin Cry1C.

Bioassay from transformed Bt4 with *cry1Ag* showed also positive results of toxicity against *S. littoralis* (Figure 10).

The toxicity of transformed Bt4 with *cry1C/cry1Ag* was 18 time more than that of *entomocidus* against *S. littoralis* and 28 time more than that of transformed *Bt* with only *cry1C*. The mixture of equal concentrations of spore-crystal complex from the transformed *Bt* with *cry1C*

and transformed *Bt* with *cry1Ag* showed similar toxicity against *S. littoralis* comparable to that from transformed *Bt* with *cry1C/cry1Ag*. On the other hand the transformed HD73 showed LC_{50} against *S. littoralis* similar to that from transformed *Bt* with *cry1C/cry1Ag* which was 6.6 ppm and 2.2 ppm respectively (Table 4).

4 Discussion

This study aimed to construct a potent *Bt* strain against *S. littoralis*. Toward this end, both *cry1C* and the local (Egyptian) *cry1Ag* genes were chosen to construct a genetically modified *Bt* strain. The Egyptian *Cry⁻ Bt* strain Bt4 was used for that aim. The *Bt* strain *entomocidus* was also used as a positive control, which it is one of the most important strains that used against Noctuidae. It produces potential δ -endotoxin and shows high potential activity against *S. littoralis* (Salama and Foda, 1982), it produces *Cry1C* only.

Several strategies have been used to introduce and stably maintain cloned *cry* genes in *Bt*. In this work the gene transfer system was the *E. coli-Bt* shuttle vector pHT7593. This vector made from *E. coli* ori joined with bacilli ori, which showed high stability in *Bt* strains.

A 4.1 kb DNA fragment of *cry1C* was liberated from pTZ19R/*cry1C* by digestion with *HindIII* and cloned into the *HindIII* site of pHT7593 vector, then used to transform *E. coli* JM109 strain. Analysis of recombinant clones predictive of cloned *cry1C* was carried out using PCR. The specific primers IAF & IAR (Regev et al., 1996) and IAF & ICR were used and they gave the expected PCR products 2.2 kb and 3.7 kb respectively to confirm the presence of *cry1C* in the selected clone 3 (Figure 2A). When clone 3 was digested with the restriction enzyme *HindIII* it gave the ~ 4.1 kb fragment of *cry1C* and the ~ 7.1 kb fragment of the pHT vector and when digested with *SmaI* it gave the ~ 11 kb of the linear form of clone 3 (data not shown). A *HincII* fragment carrying the full-length *cry1Ag* gene was ligated to *SmaI* digested pHT7593. Additionally, *HincII*-digested *cry1Ag* was ligated to *SmaI*-digested pHTNC3 (Figure 1). Screening of the recombinant *E. coli* cells harboring *cry1Ag* by polymerase chain reaction was performed. The primer set specific for *cry1Ac* (1ACF & 1ACR) was used and gave the expected 2 kb PCR product (Figure 2B). Accordingly, clone 10 was selected as recombinant *E. coli* harboring *cry1Ag*. In addition, screening of recombinant *E. coli* cells harboring both the *cry1C* and *cry1Ag* by polymerase chain reaction was done. The primer sets 1ACF & 1ACR and 1AF & 1AR specific for *cry1Ag* and *cry1C* respectively were used. Both of them detected the presence of *cry1Ag* and *cry1C*, which gave the 2 kb and 2.2 kb PCR products respectively (Figure 2C). Clone 12 was selected as a recombinant *E. coli* harboring *cry1Ag* and *cry1C*.

Expression of *cry1C* in *E. coli* (clone 3) was examined and analysed on SDS-PAGE and the total protein profile showed the ~ 132 kd corresponding to *Cry1C* toxin protein (Figure 3), the same results were revealed by (Kalman et al., 1993) who worked with the same *cry1C* in a similar experiment. The protein profile also showed a protein band in the region between 55 and 42 kd, this band might belong to the expressed protein from the plasmid vector, which was not found in the non-recombinant *E. coli* cells. Protein expression profile for clone 10 and clone 12 was also analyzed on SDS-PAGE. *Cry1Ag*-harboring and *cry1C/cry1Ag*-harboring *E. coli* cells showed the ~ 133 kd and ~ 135 kd respectively (Figure 3). Thus the construction and gene expression of clones 3, 10, and 12 were performed in *E. coli* strain JM109 host cells. The next step was to transform these constructs to the native *Bt* host cells. Toward this end, pHTNC3, pHTNAg, and pHTN1CAg were separately electroporated into the *Cry⁻ Bt4* recipient cells. Plasmid profiling was conducted to select for the recombinant Bt4 cells (data not shown).

Polymerase chain reaction was used to detect the presence of the *cry1C* and *cry1Ag* genes in the recombinant *Bt* strains. The specific primer sets IAF & IAR was used to obtain a 2.2 kb *cry1C* coding region starting from the translation start site and containing the sequence of the 1st 756 amino acids as described previously. Moreover the reverse primer ICR (designed in this study) was used with the forward primer IAF to get the full length of *cry1C* gene (~ 3.7 kb). When used with the recombinant strains that harboring pHTNC3, they gave the expected 3.7 kb PCR product (Figure 4A), indicating that *cry1C* was fully cloned into the pHT vector. The Lep1A & 1B and Lep2A & 2B primer sets specific for detection of *cry1A* toxin genes, were used to detect the *cry1Ag* (1Ac like) in the recombinant *Bt* strains and they gave the expected PCR products 490 bp & 908 bp (Figure 4B).

The expression of the cloned genes were examined and analyzed on SDS-PAGE (Figure 5). Our results revealed that the cloned crystal protein genes *cry1C*, *cry1Ag*, and *cry1C-Ag* were highly expressed in the Bt4 *Cry⁻* strain. This finding was similar to the results obtained by Lecadet et al., 1992 who introduced the *cryIIIA* gene cloned in pHT7911 into the 407 *Cry⁻* isolate of *Bt* by electroporation. Very large rhomboid crystals were seen as a result of the high level expression of the *cryIIIA* gene.

In this study, crystal proteins purified from the genetically modified *Bt* strains were solubilized in pH 9.5 and analyzed on SDS-PAGE. The results showed a major band that was migrated at ~ 133 kd. The trypsinization of ~ 133 kd with TPCK trypsin gave the ~ 65 kd of activated toxin (Figure 6).

Western immunoblotting assay using polyclonal antibody raised in rabbit against the activated toxins of *Bt kur-*

HDI was performed. However, molecular mass of Cry1C, 132.8 kd, is slightly different from cry1Ag, 133 kd. Our results showed that the antiserum reacted with the proteins from all the recombinant *Bt* strains (Figure 7). The immunoblotting showed a thick band appeared as more than one protein in both the protoxin and activated toxin from the recombinant *Bt* strain that harboring pHTN1CAG. The thickness of the protein band might indicate the presence of more than one protein as a result of transformation. Our results agreed with the results obtained by (Lereclus et al., 1992), which introduced cryIIIA cloned in pHT5132 into the *Bt* strain kur-HD73 by electroporation. The cry1Ac formed bipyramidal crystals, whereas cryIIIA formed flat rectangular crystals. This recombinant HD73-II produced a great total quantity of protein than the parental strain. Furthermore, it showed insecticidal activities against both the two orders of insect, coleoptera (resistance to CryIIA) and lepidoptera (resistance to Cry1Ac). Accordingly, microscopic examinations of the Bt4 (Figure 8) and the recombinant *Bt* strains harboring the pHTNC3 (Figure 9A), pHTNAG (Figure 9B), and pHTN1CAG (Figure 9C) were performed. All *Bt* strains were grown on the same sporulating media, incubated for the same period of time and at the same temperature. They showed spores from the parent strain *Bt* Bt4 and the expressed Cry1C, 1Ag, and 1C & 1Ag as insecticidal crystal proteins from the transformed ones. The bipyramidal shaped of crystals were detected clearly in all the recombinant *Bt* strains. These microscopic examinations confirmed the molecular findings represented by presence of transferred plasmids, PCR-amplification products, expressions of cloned cry genes, and western blotting. The ability of the recombinant strains to sporulate under normal growth conditions and in the presence of selectable antibiotic (100 µg/ml kan) was investigated. When cultures of Bt4 Cry⁻ and the transformed *Bt* strains were grown until they reached the sporulating phase, the Bt4 remained for up to 10 days as spores and never gave any crystals. On the other hand the transformed strain cultures showed after 3 days, spores and crystals. It was also observed that part of the spore population degenerates whereas crystals were in extreme high numbers. Similar observations have been reported by (Donvan et al., 1988) and (Lecadet et al., 1992), who electroporated the cloned cryIIIA in pHT7911 into the lepidoterans active *Bt* strain aizawai. Accordingly, transformants displayed dual specificities with levels of activity identical to those of the parental strains. Our results also agreed with those obtained by (Sanchis et al., 1997), who worked on the same gene combinations (introduced recombinant cry1C into kur-HD73) and proposed that the expression of these two genes is summed in the recombinant strain, presumably because they do not compete for rate-limiting elements of the gene expression since the expression systems of the

two genes are different. Our results also show the same observation with the *Bt* strain that harbors both the cry1C and 1Ag although they are found on the same vector, but each under its own promoter and regulatory region.

In the present work, bioassay clearly confirmed that the expression of cry1C in the Cry⁻ Bt4 recipient strain make it active against *S. littoralis* (Table 4). The toxicities of the transformant and of the parent strains against *S. littoralis* were determined. The *Bt* cry1C-Ag harboring showed high activity against *S. littoralis*, whereas the parental recipient strain showed no toxicity to it. Chang et al., 1992, who transformed the cry1VD cloned in pHT3101 into a Cry⁻ *Bt* strain, obtained similar results. The obtained protein was comparable in size, shape, and toxicity to that produced by parental *Bt* subsp *morrisoni*. Baum et al., 1990 who cloned cry1Ac and introduced it into the *Bt* strain subsp *aizawai*. Accordingly, a recombinant strain exhibiting good isecticidal activity against *S. exigua* and having an improved spectrum of insecticidal activity was obtained. In comparison with all the deduced studies, our study was unique which it targeted the potency and the high toxicities of the constructed *Bt* strains against the Egyptian cotton leaf worm *S. littoralis*. We were able to construct a *Bt* recombinant strain containing a unique combination of cry1 genes, cry1Cb and cry1Ag cloned in the pHT shuttle vector.

In this study Cry1C-harboring HD73 was a good model, for comparison with the pHTN1CAG-harboring *Bt* strain. Cry1C/cry1Ag expressing Bt4 *Bt* strain had LC₅₀ approximately twenty fold lower than that of cry1C expressing Bt4 strain and fifteen fold lower than that showed by *entomocidus*. It was also 47 fold lower than that obtained from cry1Ag-expressing *Bt* strain. In conclusion, we suggest that the increase in toxicity against *S. littoralis* when cry1Ag was introduced with cry1C, a gene which is highly active and potent against *S. littoralis*, is additive. Lereclus et al., 1992 who used different gene combinations against species of coleoptera and species of lepidoptera, described that broaden in the activities was additive, agreed with our suggestion.

When crystal-spore complexes from *entomocidus* *Bt* strain (Cry1C) were mixed with equal concentrations, of crystal-spore complexes from kur-HD73 (Cry1Ac), it showed toxicity against *S. littoralis* 2 fold more than that caused by crystal-spore complexes from *entomocidus* *Bt* strain alone (Table 4). This result also reinforces our opinion that the increase in toxicity in this study was additive. In a similar attempt, to increase the insecticidal effect of cry1C on the larvae of *S. littoralis*, Regev et al., 1996, used a combination of cry1C and endochitinase. They used it in only a transgenic system in which the Cry protein is not expressed in crystalline form.

References

- Adams LF, Mathewes S, O'Hara P, Petersen A, Gurtler H (1994) Elucidations of the mechanism of cry IIIA over production in a mutagenized strain of *Bacillus thuringiensis* var-*tenebrionis*. *Mol Microbiol* 14:381-389
- Arantes O, Lereclus D (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108:115-119
- Baum JA, Coyle DM, Jang CS, Gilbert MP, Gawron-Burke C (1990) Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 56:3420-3428
- Baum JA, Kakefuda M, Gawron-Burke C (1996) Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl Environ Microbiol* 62:4367-4373
- Belliveau BH, Trevors JH (1989) Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation. *Appl Environ Microbiol* 55:1649-1652
- Bernhard K, Jarrett P, Meadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, Rodgers P, Burges HD (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* : worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J Invertebr Pathol* 70(1):59-68
- Bone EJ, Ellar DJ (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* 58:171-178
- Burges HD, Hurst JA (1997) Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J Invertebr Pathol* 30:131-139
- Burke GC, Baum JA (1991) Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. *Genet Eng* 13:237-263
- Carozzi NB, Karmer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG (1991) Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl Environ Microbiol* 57(11):3057-3061
- Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A (1995) Specific PCR primers directed to identify cry1 and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 61:3826-3831
- Ceron J, Covarrubias L, Quintero R, Lina L, Bravo A (1994) PCR analysis of the cry1 insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 60:353-356
- Chak K-F, Tseng M-Y, Yamamoto T (1994) Expression of the crystal protein gene under the control of the α -amylase promoter in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 60:2304-2310
- Chang C, Dai S-M, Frutos R, Federici BA, Gill SS (1992) Properties of a 72 Kilo-dalton mosquitocidal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* by using the shuttle vector 3101. *Appl Environ Microbiol* 58:507-512
- Chang C, Yu Y-M, Dai S-M, Law SK, Gill SS (1993) High-level cry 1VD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-Kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl Environ Microbiol* 59:815-821
- Crickmore N, Bore EJ, Williams JA, Ellar DJ (1995) Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *FEMS Microbiol Lett* 131:249-254
- Crickmore N (2006) Beyond the spore-pest and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *J Appl Microbiol* 101:616-619
- Delucca AJ II, Simonson J, Larson AD (1979) Two new serovars of *Bacillus thuringiensis* : serovars Dakota and Indiana (serovars 15 and 16). *J Invertebr Pathol* 34:323-324
- Donovan WP, Gonzalez JM Jr, Gilbert MP, Dankocsik C (1988) Isolation and characterization of EG-2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae and nucleotide sequence of the toxin gene. *Mol Gen Genet* 214:3665-372
- Dulmage HT (1971) A proposed standardizes bioassay for formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J Invertebr Pathol* 18:240-245
- Escrive B, Ramirez ACM, Real MD, Silva FJ, Ferre J (1994) Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins in the midgut brush border membrane of potato tuber moth *Pthorimaea operculella* (Zeller). *Arch Insect Biochem Physiol* 26:3315-3320
- Fang J, Xiaoli X, Ping W, Zhou ZJ, Anthony SM, Jiaan C, Ming FG, Zhicheng S (2007) Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl Environ Microbiol* 73:956-961
- Feitelson JS (1993) The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: Kim L (ed) Advanced engineered pesticides. New York : Dekker, pp 63-72
- Feitelson JS, Payne J, Kim L (1992) *Bacillus thuringiensis* : insect and beyond. *Bio/Technology* 10:271-275
- Ferre J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M (1991) Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 88:5119-5123
- Gamel PH, Piot JC (1992) Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene* 120:17-26
- Hofte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53:242-255
- Kaelin P, Morel P, Gadani F (1994) Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). *Appl Environ Microbiol* 60:19-25
- Kalfon AR, De Barjac H (1985) Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera litoralis*. *Entomophaga* 30:177-186
- Kalman S, Kristine LK, John LL, Yamamoto T (1993) Cloning of a novel cry1C type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Galleriea*. *Appl Environ Microbiol* 59:1131-1137
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature (London)* 227:680-685
- Lambert B, Peferoen M (1992) Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* : facts and mysteries about a successful biopesticide. *Biosci* 42:112-122
- Lampel SJ, Canter GL, Dimock MB, Kelly JL, Anderson JJ, Vratani BB, Foulke JS, Turner JT (1994) Integrative cloning, expression and stability of the cry1A(C) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Cynodontis*. *Appl Environ Microbiol* 60:501-508
- Lecadet MM, Chaufaux J, Ribier J, Lereclus D (1992) Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl Environ Microbiol* 58:840-849
- Lecadet MM, Chaufaux J, Ribier J, Lereclus D (1992) Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl Environ Microbiol* 58:840-849
- Lee MK, Curtiss A, Alcantara E, Dean DH (1996) Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl Environ Microbiol* 62:583-586
- Lereclus D, Vallade M, Chaufaux J, Arantes O, Rambaud S (1992) Expansion of the insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Bio/Technology* 10:418-421
- Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M-M (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 60:211-218
- Lillely M, Ruffel RN, Somerville HJ (1980) Purification of the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Gen Microbiol* 118:1-11
- Loutfy MS (1973) Standard method for rearing the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* on natural and semisynthetic diet. Cairo : Univ, Thesis
- Lu H, Rajamohan F, Dean DH (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Aa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J Bacteriol* 176:5554-5559
- Luchansky JB, Muriana PM, Klaenhammer TR (1988) Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol Microbiol* 2:637-646
- Luo K, Lu Y-J, Adang MJ (1996) A 106 Kda from of aminopeptidase is a receptor.

- tor for *Bacillus thuringiensis* Cry IC δ -Endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 26:783-791
- Mahillon J, Chungiatupornchai W, Decock J, Dierickx S, Michiels F, Peferoen M, Joos H (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* 60:205-210
- Masson L, Prefontaine G, Brousseau R (1989) Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* 60:273-278
- Mettus A-M, Macaluso A (1990) Expression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin genes during vegetative growth. *Appl Environ Microbiol* 56:1128-1134
- Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1995) Evaluation synergistic interactions between the Cry1VA, Cry1VB and Cry1VD components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol* 66:131-135
- Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *S. littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol* 62:3581-3586
- Salama HS, Foda MS (1982) A strain of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* with high potential activity on *S. littoralis*. *J Invertebr Pathol* 39:110-111
- Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D (1996) Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strain by using the sporulation non-dependent expression system of *cryIIIA* and a site specific recombination vector. *J Biotechnol* 48:81-96
- Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D (1997) A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:779-784
- Schurter W, Geiser M, Mathe D (1989) Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned δ -endotoxin genes. *Mol Gen Genet* 218:177-181
- Tabashnik BE, Finson N, Greeters FR, Moar WJ, Johnson MW, Luo K, Adang MJ (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:4120-4124
- Van Rie J, Jansens S, Hofte H, Degheele D, Van Mellaet H (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl Environ Microbiol* 56:1378-1385
- Wu D, Johnson JJ, Federici BA (1994) Synergism of mosquitocidal toxicity between *cytA* and Cry1VD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 13:965-972

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) based molecular analysis of Egyptian barley lines and landraces differing in their resistance and susceptibility to leaf rust and net blotch diseases

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Sami S. Adawy¹, Mahmoud M. Saker^{2,3}, Wafaa M. Haggag⁴ and Haniya A. El-Itriby¹

Abstract

Twenty four Egyptian lines and landraces, representing Egyptian barley germplasm were collected and screened for resistance to net blotch (*Pyrenophora teres*) and leaf rust (*Puccinia hordei*) diseases. Two landraces, collected from Rafah (Sinai), Awlad Ali (Marsa Matrouh) and the two lines AT 5 and DT 1 (Barley Dept., ARC) showed extreme resistance to both net blotch and leaf rust. The line AT 42 is the most susceptible one for net blotch and leaf rust. Genetic diversity among the 24 accessions with various levels of resistance and susceptibility to net blotch and leaf rust was evaluated using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). AFLP analysis generated large number of polymorphic bands (markers) and allowed easy identification of the different genotypes at the DNA level. The developed AFLP-based dendrogram divided the barley genotypes into two main clusters in accordance with their origin (native landraces), and resistance and susceptibility to diseases (lines derived from the same crosses). The developed AFLP fingerprints for the newly identified valuable net blotch and leaf rust resistant Egyptian barley accessions reported herein could support the future Egyptian barley germplasm collection, preservation and utilization.

Keywords: *ALFP, Hordeum vulgare, genetic diversity, Puccinia hordei, Pyrenophora teres*

Zusammenfassung

ALFP basierte Molekularanalyse der Resistenz ägyptischer Gersten-Linien und -Landrassen gegen Blattrost und Netzfleckenkrankheit

Mit Hilfe genetischer Marker wurde die große Variabilität der Resistenz 24 ägyptischer Gersten-Linien und -Landrassen gegenüber Blattrost und Netzfleckenkrankheit untersucht. Insbesondere die Landrassen erwiesen sich als beachtenswerte genetische Ressource für die zukünftige Züchtung widerstandsfähiger Gerstensorten.

Schlüsselwörter: *ALFP, Hordeum vulgare, genetische Diversität, Puccinia hordei, Pyrenophora teres*

¹ Agricultural Genetic Engineering Research Institute (AGERI), ARC, Giza/ Egypt

² Plant Biotechnology Dept., National Research Center, Dokki, Cairo/Egypt; Email: sakrmahmoud@yahoo.com

³ Plant Molecular Genetics Group, Nobel Project, National Research Center, Dokki, Cairo/Egypt

⁴ Plant Protection Dept., National Research Center, Dokki, Cairo/Egypt

1 Introduction

Barley (*Hordeum vulgare*) ranks as the world's fourth major cereal crop after maize, wheat and rice. It is also one of the world's ancient cereal crops with archaeological remains suggesting that it was first domesticated in the fertile crescent around 10,000 years ago - at about the same time as wheat. Barley is very closely related to wheat and this similarity allows the production of fertile hybrids between the two species (Zohary and Hopf, 1988). Improvements in its yield have been due to a large number of factors but improved varieties have certainly played a major role. Disease was seen as the key limitation on yield in the early 1980s and was the major focus of breeding programs. Fungal diseases have been considered as one of the main causes of crop losses ever since mankind started to cultivate plants (Oerke et al., 1994). Estimates of yield losses in barley due to net blotch disease only range from 15 % in Canada (Martin, 1985), 35 % in the United States (Steffenson et al., 1996) and can reach up to 40 % in other countries (Shipton et al., 1973). Little attention has been given to large scale cultivation of barley in Egypt and consequently Egyptian barley germplasm. In the North-west coastal region of Egypt, the Bedouins grow their own local adapted genotypes continuously in isolated areas therefore one can expect an interesting genetic diversity, which can be introduced in breeding programs to improve barley cultivars.

The recent development in molecular genetic technology particularly in the development of the so called "Molecular Markers", which are used to reveal polymorphism, has greatly improved research in many disciplines such as Taxonomy, Phylogeny, Ecology, Genetics and Evolutionary biology (Tingey and Del tufo, 1993). Molecular markers can also facilitate quantification of existing genetic diversity and uncovering duplicate or very similar genotypes, and the identification of unique variants or genotypes for expanding the useful variation. AFLP is a PCR-based molecular marker that had been used for the characterization and evaluation of germplasm and genetic resources (Vos et al., 1995). AFLP was acknowledged as efficient and powerful tool in the prospection of biodiversity in important crop species (Hongtrakul et al., 1997; Milbourne et al., 1997 and Paul et al., 1997). With the aid of molecular markers, genes of interest were tagged, traced and used in breeding programs, and to select disease resistant germplasm (Stam, 1997).

In the case of barley, molecular marker technology was employed successfully for the identification and classification of barley germplasm (Struss and Plieske, 1998), assessment of the genetic relatedness of barley accessions (Yang and Quiros, 1993), development of molecular markers linked to rust resistance gene (Nachtigall et

al., 2000), characterization of genetic diversity in malting barley cultivars, biological and molecular evaluation of native barley germplasm (Czembor, 2001 and Saker 2005a and b and Saker et al., 2005) and mapping of resistance genes (Chelkowski et al., 2003). The objectives of this study were to (1) survey the Egyptian barley germplasm for new resources for resistance to net blotch and leaf rust, (2) develop salient AFLP profiles (fingerprints) of the identified valuable genotypes and landraces, and (3) assess the genetic diversity within the selected landraces differing in their resistance and susceptibility to fungal diseases.

2 Materials and methods

2.1 Plant Material

Seed samples of twenty four barley landraces and lines representing Egyptian barley germplasm and differing in resistance and susceptibility to leaf rust and net blotch were used in this study. Cultivated genotypes (lines) were kindly provided by the Barley Department, Field Crops Research Institute, Agricultural Research Center (ARC), Ministry of Agriculture, Egypt. Meanwhile, native barley landraces, grown by Bedouins were collected from different locations of Egypt. i.e., Awlad Ali, El-Kasr and El-Awama villages (Northwest Coast, Marsa Matrouh), Rafah, El-Sheikh Zowaid and Al-Arish (Northeast coast, Sinai). The name and pedigree of these lines are shown in Table 1.

2.2 Genomic DNA isolation

Plants were grown in a greenhouse. Five plants were sampled from each genotype and total cellular DNA of the pooled sample was prepared as described by DNeasy Plant Mini Kit (cat no. 69104). Agarose gel electrophoresis confirmed that the DNA was of high molecular weight with no degradation or contaminating RNA.

2.3 AFLP analysis

The AFLP procedure was performed with minor modifications according to the protocol of Vos et al. (1995) that is supplied with the AFLP Analysis System I kit (Gibco, BRL). Approximately 500 ng DNA was digested simultaneously with *EcoRI* and *MseI* at 37 °C for 2 hr. The digested samples were incubated at 70 °C for 15 min to inactivate the restriction endonucleases. *EcoRI* and *MseI* adapters were ligated to the digested samples at 20 °C for 4 hr. This was done to generate template DNA for amplification. Preamplification was carried out with + 1 - primers each carrying one selective nucleotide (*EcoRI* + A and *MseI* + C) in a thermocycler for 20 cycles (94 °C/30s, 56 °C/60s and 72 °C/60s). The amplification products were diluted 50

Table 1:

The name, pedigree and location lines and landraces of barley

Code	Lines and Landraces	Name	Pedigree	Locations
1	El-Arish	-----	-----	Sinai
2	El-Sheikh-Zowaid	-----	-----	
3	Rafah	-----	-----	
4	Awlad- Ali	-----	-----	Marsa - Matrouh
5	El-Kasr	-----	-----	
6	El-Awama	-----	-----	
7	AT 1	Linaze-Bar/Robust/Qunina	CMB93.910-A-1Y-1Y-1N-OY	Barley Dept., ARC
8	AT 58	Lignee 527/Chn01//Gustoe/4/ Rhn-08/3/DeirAlla 106//DL71 /Strain205	Sk.Sel98/99 no.134-2-1F3SP	
9	AT 40	PI2325/Maf102//Cossak/3/Trump/4/Aths/Rihano1	-----	
10	AT 42	Mari/Aths*2//Arizona5908/At-hs*Arar/Lignee 527	Egypt, 99/00.Scr,1/4	
11	AT 10	Aths/Lignee686//Orge905/Cr. 289-53-2	Egypt, 00/01.Scr1 no. 34	
12	AT 11	Lignee527/NK1272//ULB70-63	Egypt, 00/01.Scr1 no. 33	
13	AT 25	Rhn/Lignee527	ICB 82-0897-4AP-OAP	
14	AT 26	Lignee527/NK1272//Alanda	ICB 91-0517-7APP-OAP	
15	AT 4	Lignee527/NK1272//UL76252/Jaidor	ICB 91-1019-21AP-OAP	
16	AT 6	QB813.2	BCB99-00 no.46	
17	AT 3	Aths/Rihane-01// Sawsan/ Lignee640	Egypt, 99/00.Sci,1 no. 9	
18	AT 22	Lignee527 / NK1272	-----	
19	AT 5	26216/6/CI 010214/CM67/U. Sask 1800//Pro/CM67/ 3/ DL70/5/Nacha 2	ICB 94-0561-OAP	
20	AT 29	Lignee527// Chn-01 //Allanda	ICB 93-0372-OAP-8AP-OAP	
21	AT 15	Giza 123	-----	
22	AT 20	Rod586/Nopal*s/3/PmB//Aths//Bc/4/F2CC33 MS/CI 07555	ICB 93-434-OAP-9AP-OAP	
23	DT 1	-----	Arona5908/AdHis" Lignee	
24	DT 2	-----	Dhm.Unk.	

The sources of names and pedigrees was provided from Barley Research Department/ARC

fold in TE buffer and stored at -20 °C. Selective amplification was carried out with *EcoRI* + 3 - primers and *MseI* + 3 - primers and 5µl of the diluted PCR products from the preamplification. Eighteen primer pair combinations were employed in this study. The PCR amplification was performed as follows: one cycle at 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s and 72 °C for 60 s, followed by 13 cycles of touch-down PCR in which the annealing temperature was lowered by 0.7 °C every cycle. This was followed by 23 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 60 s.

2.4 Gel analysis

The reaction products were mixed with equal volumes of formamide loading buffer (98 % formamide,10mm EDTA, bromophenol blue and xylene cyanol), denaturated by incubating at 90 °C for 3 min and quickly cooled on ice. The products were analyzed on 8 % denaturing polyacrylamide gels. The gel was run at constant power (50 - 55 W) until the dye was about 2/3 down the length of the gel. The gel was silver stained using a DNA silver staining kit

(Promega), according to the manufacturer instructions.

2.5 Analysis of AFLP data

AFLP polymorphic bands were scored as present (1) or absent (0). Estimates of similarity among all genotypes were calculated according to Dice coefficient (Sneath and Sokal, 1973) definition of similarity: $siJ = 2a / (2a + b + c)$, where siJ is the similarity between two individuals i and J , a is the number of bands present in both individuals, b is the number of bands present in i and absent in J , and c is the number of bands present in J and absent in i , the matrices of similarity were analyzed by the Un weighted Pair-Group Method Analysis (UPGMA) and the dendrograms were obtained.

2.6 Pathogens

For artificial infestation of different accessions, local isolates (Egyptian biotypes) of *Puccinia hordei* and *Pyrenophora teres* were isolated from the barley plants grown

in Experimental Farm of National Research Center at El-Kanater El-Khairea Egypt. The isolates were purified by single spore, maintained and propagated. Strains of conidiosa (*P. hordei*) were produced on leaves of their original barley lines in the greenhouse. For inoculation, pieces of infected leaves with abundant sporulating colonies or pustules (10 mm in diameter) were washed in 100 ml sterilized distilled water containing 0.01 % Tween-80. The spore suspension adjusted to 10^5 spores/ml was used. Frequent virulence checks assured their purity throughout the experiment. Single conidia of each *P. teres* isolates were increased on V-8 juice agar at 20 °C (Miller, 1955). After seven days in culture, the cultures were washed from the agar surface, filtered through a 330µm strainer and made up into an aqueous suspension containing 12,500 conidia/ml and 0.01 % Tween-80.

2.7 Field evaluation

Field screening using naturally occurring inoculum was used to identify resistance against net blotch and leaf rust diseases in different accessions. Barley seeds were sown at rows spacing of 15 cm with width measuring 3.0 m of each accession at the NRC experimental farm at El-Kanater El-Khairea during 2004 and 2005 seasons. Planting were made on October, 15th using a randomized complete block design with three replicates for each line. Each replicate consisted of 20 plants. Irrigation was carried out as recommended. Diseases incidence of leaves was assessed 20 days intervals as the percentage of necrotic flag area or covered by lesion colonies and the lesions numbers per leaf (the fifth leaf from the top of the plant). Disease incidence of heads is calculated as the proportion of barley heads with symptoms out of a predetermined number of heads. Mean number of spores/cm² were counted during growth periods using hemocytometer. Data were recorded per 10 plants, 20 days intervals on randomly selected one lines per replicate.

2.8 Evaluation under greenhouse conditions

Resistance and susceptibility of the 24 barley accessions to net blotch and leaf rust was determined, following artificial infection of plants with spore suspensions of *Pyrenophora teres* and *Puccinia hordei* under greenhouse conditions. Pots (20 cm diameter) containing sandy loam soil were sowed with five seeds of each accessions and grown in the greenhouse at 20 ± 2 °C. Pots were arranged in a complete randomized design with three replicates for each line. Plants were sprayed with spores suspension of each fungus at concentration of 10^5 spores/ml with 0.01 % surfactant, using a hand held atomizer onto expanded leaves (about 0.5 ml per leaf). Each treatment was replicated

three times. Plants were grown for 18 - 24 h and 98 % relative humidity at greenhouse temperature in a dark room and then returned to the glasshouse for disease development for 15 day. Diseases severity were measured using a 0 - 9 scale (0 resistant, 9 susceptible) according to Finckh et al., 1999). Data were subjected to analysis of variance and treatment means were compared by an approximate Student's t-test ($p < 0.05$).

2.9 Growth analysis

At harvest stage, plant height and branch number were measured, then, the samples were dried at 60 °C for 4 days before obtaining plant dry weight. Grain dry weight was also measured.

2.10 Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance and treatment means were compared by an approximate Student's t-test ($P < 0.05$).

3 Results

3.1 Survey for resistance to net blotch and leaf rust:

A glance on data of disease severity presented in Table 2 indicates clearly that about half of the tested lines and landraces had high levels of resistance to the net blotch disease under open field conditions. The extremely resistance accessions included Rafah, Awlad Ali, El Awama, AT 1, AT 58, AT 10, AT 11, AT 25, AT 26, AT 4, AT 5, AT 6 and DT 1. Line AT 42 was identified as the most susceptible to *Pyrenophora teres*. The reactions of other landraces ranged from moderate to high resistance. In the case of the extremely resistant landraces, no symptoms were recorded until the harvest time (180 - 200 days). Symptoms were recorded during the first two months of cultivation in susceptible and moderate resistance accessions. In the case of rust, the interactions of the 24 barley accessions with the *Puccinia hordei*, expressed as disease severity (area) revealed a high degree of variation in disease resistance. The extremely resistance landraces to leaf rust included Rafah, Awlad Ali, El Sheik Zowaid, AT 1, AT 58, AT 3, AT 6, AT 5, AT 22, AT 29 and DT 1 (Table 2). The line AT 42 is also the most susceptible one for net leaf rust.

Based on the evaluation of the collected germplasm in open field under natural infection conditions, plants were categorized as extreme resistance (R), moderate resistance (M) and susceptible (S). Seeds were collected and subjected to evaluation under greenhouse conditions. Reactions against different local pathogen races (Egyptian biotypes) of *Pyrenophora teres* and *Puccinia hordei* were recorded

Table 2:

Infection responses (disease severity) of the 24 barley accessions to *Pyrenophora teres* and *Puccinia hordei* pathogens grown under natural infested field conditions). Response of selected barley lines against net blotch and leaf rust after 15 days of inoculation with spore suspension under greenhouse conditions. A 0 - 9 scale was used for rating disease severity (0 = resistant, 9 susceptible).

Accessions	Net blotch severity* % under natural field conditions						Net leaf Rust severity* % under natural field conditions						Re- sponse against Net blotch	Re- sponse against Leaf rust
	80	100	120	140	160	180	80	100	120	140	160	180		
El-Arish	0 ^y	0	0	0	0	0.23	0 ^y	0	0	0	16.5**	25.3**	0.00	3.36
El-Sheikh-Zowaid	0	3.54	11.5	12.3	15.6	15.6	0	0	0	0	0	0	0.87	0.00
Rafah	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
Awlad- Ali	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
El-Kasr	0	0.65	1.56	1.65	1.87	1.98	0	0	0	0	3.56	8.54	0.27	0.00
El-Awama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.25	5.65	0.00	0.79
AT 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.97	0.00
AT 58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.65	0.00
AT 40	4.65*	20.6*	58.9*	78.6*	85.6*	91.2*	0	5.32	6.45	0.23	28.6*	49.3*	0.00	4.5
AT 42	5.65*	22.6*	55.6*	75.8*	95.5*	100*	0	0.21	0.98	28.3*	38.0	51.2*	7.23	4.68
AT 10	0	0	0	0	0	0.34	0	0	0.28	30.5*	2.78	49.0	0.00	1.06
AT 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21	28.0	39.0	0.00	2.8
AT 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.35	3.54	0.00	0.75
AT 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.56	1.36	0.00	1.00
AT 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19.3**	28.5**	0.00	2.54
AT 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
AT 3	4.23	6.54	33.6	60.5*	75.8*	100*	0	0	0	0	0	0	6.23	0.00
AT 22	5.65*	12.3*	45.1*	76.6*	81.6*	100*	0	0	0	0	0	0	5.14	0.00
AT 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
AT 29	0	0	0	0	0.21	0.12	0	0	0	0	0	0	0.42	0.00
AT 15	0	0	0	0.21	0.41	1.21	0	0	0	0	23.6**	31.6**	0.32	4.0
AT 20	2.3	6.78	8.98	10.3	11.5	11.6	0	0	0	0	1.25	6.54	5.6	0.8
DT 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
DT 2	2.35**	5.65**	20.5**	66.5**	74.5**	80.6**	0	0	0	0	0.89	1.32	0.32	0.21

* Disease severity was expressed as the percentage of leaves area with disease symptoms

^y Each value is the mean of three replicates

Disease was different from the mean of pure stands at *P < 0.05 and ** P < 0.01

after 15 days of inoculation (Table 2). The results of evaluation under greenhouse conditions are in general agreement with the results of evaluation in open field under natural infection conditions. In other words, the majority of extremely resistant landraces based on the results of field evaluation behaved in the same fashion under greenhouse conditions (Table 2). Combined data of field evaluation and greenhouse evaluation for net blotch and leaf rust indicated that four landraces, collected from Rafah (Sinai), Awlad Ali (Marsa Matrouh) and the two lines AT 5 and DT 1 (Barley Dept., ARC) showed extreme resistance to both net blotch and leaf rust. While, the line AT 42 was the most susceptible one for both diseases net blotch and

leaf rust. The rest of investigated lines and landraces were moderately resistant to one of the two diseases (Table 2).

3.2 AFLP analysis

AFLP fingerprints of the 24 barley accessions were performed using 20 AFLP primer combinations (Table 3). AFLP amplification data revealed a total number of 1203 amplified DNA fragments ranging in length from 40 to 1000 bp, out of them, 588 were polymorphic, i.e. the percentage of polymorphism was 4.8 %. The polymorphic bands were distributed across the genotypes. On average, 48.88 distinguishable bands were observed per primer combi-

nation, and an average of 20.4 of these AFLP bands was polymorphic. The number of amplicons (bands) in the profiles varied, depending on the primer combination and genotype.

Table 3:

AFLP primer combinations, total number of amplicons, polymorphic amplicons, polymorphism percentage and levels of polymorphism detected by different primer combinations for the 24 barley accessions

Primer omb. code	Primer combination	Total number of amplicons	Polymorphic amplicons	Polymorphism %	Fragments size range scored
1 / 5	E-AAC/M-CTA	83	14	16.9	50 - 500
1 / 8	E-AAC/M- CTT	28	21	75	60 - 200
2 / 5	E-AAG/M-CTA	66	22	33.33	70 - 500
2 / 7	E-AAG/M-CTG	88	32	36.36	40 - 520
2 / 8	E-AAG/M-CTT	27	18	66.67	107 - 520
3 / 3	E-ACA/M-CAG	46	20	43.48	94 - 490
3 / 7	E-ACA/M-CTG	63	14	22.22	80 - 500
4 / 2	E-ACC/M-CAC	80	34	42.5	50 - 800
4 / 5	E-ACC/M-CTA	41	29	70.73	65 - 550
4 / 7	E-ACC/M-CTG	65	20	30.77	50 - 600
5 / 4	E-ACG/M-CAT	64	14	21.88	65 - 450
6 / 3	E-ACT/M-CAG	52	48	92.31	60 - 500
6 / 7	E-ACT/M-CTG	59	35	59.32	45 - 520
6 / 8	E-ACT/M-CTT	59	36	61.02	40 - 500
7 / 3	E-AGG/M-CAG	31	27	87.1	60 - 490
7 / 5	E-AGG/M-CTA	85	47	55.29	82 - 1000
7 / 8	E-AGG/M-CTT	65	40	61.54	60 - 375
8 / 2	E-AGG/M-CAC	74	53	71.62	65 - 570
8 / 3	E-AGG/M-CAG	79	40	50.63	68 - 870
8 / 6	E-AGG/M-CTC	48	24	50	50 - 517
Total		1203	588	48.88	

3.3 Unique positive and negative AFLP markers

Data extracted from AFLP analysis using twenty AFLP primer combinations led to the development of unique specific markers to identify the 24 barley accessions. Each of these primer combinations revealed unique markers characterizing one or more genotypes. The total number of unique bands across the 24 barley accessions was 143 unique markers. These markers ranged in size from 60 bp to 460 bp (Table 4). The total number of unique markers per accession ranged from 1 to 11. The highest number was exhibited by DT 1 and DT 2 while the lower number of unique marker was revealed by El-Awama, AT 1, AT 25, AT 6 and AT 3. Figure 1 shows the salient AFLP fingerprints of the investigated lines and landraces using primer combination (5/3).

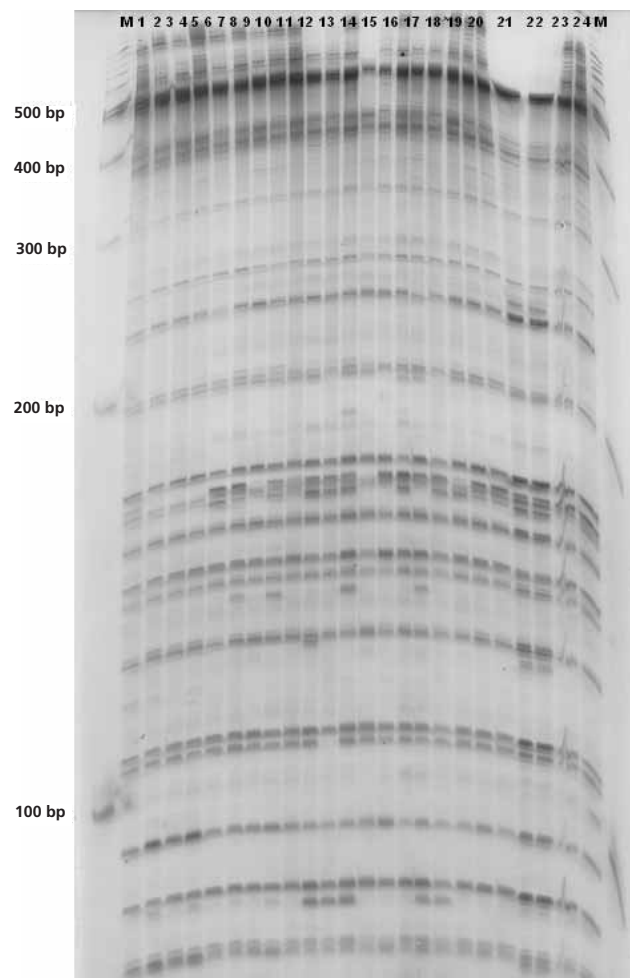


Figure. 1:

AFLP profiles of the twenty four barley landraces and lines, generated using primer combination 5/3

3.4 Genetic relationships among investigated lines and landraces

The developed AFLP-based dendrogram (Figure 2) grouped the 24 barley accessions into two main clusters. The first cluster included all native landraces collected from Sinai and Marsa Matrouh regions, i.e. El-Arish (1), El-Sheikh Zowaid (2), Rafah (3), Awlad Ali(4), El-Kasr (5) and El-Awama (6) in addition to AT 1 (7) and AT 58 (8). The second cluster comprised two subclusters. The first subcluster contained 7 lines namely, DT 1 (23), DT 2 (24), AT 20 (22), AT 15 (21), AT 29 (20) and AT 5 (19). The second sub cluster contained the rest of investigated accessions (9 lines). The least average differences (the highest genetic similarity) was scored between El-Sheikh Zowaid and Rafah landraces (0.97), meanwhile, the lowest genetic similarity was detected between DT 2 (24) and Awlad Ali (0.87). The developed AFLP-based dendrogram indicated clearly that all barley landraces collected from Sinai showed highest similarity

Table 4:

Discriminative AFLP markers could distinguish among the 24 Egyptian barley accessions

Marker (bp) Accessions	E-AAC/ M-CTA (1-5)	E-ACC/ M-CAC (4-2)	E-AGG/ M-CAT (5-4)	E-AAG/ M-CTA (2-5)	E-AAC/ M-CTA (3-3)	E-ACA/ M-CAG (3-7)	E-ACT/ M-CAG (6-3)	E-ACT/ M-CTG (6-7)	E-ACT/ M-CTT (6-8)	E-AGG/ M- CAG (7-3)	E-AGG/ M-CTA (7-5)	E-AGG/ M-CAC (8-2)	E-AGG/ M-CAG (8-3)
1 Al-Arish	91							100	245	97, 98, 110, 143, 146, 305, 360			
2 El-Sheikh Zowaid					136, 138						97, 98, 110, 305, 360		
3 Rafah									348	220, 245	110, 184, 305, 360		73, 76, 134
4 Awlad Ali		76								245	110, 143, 184, 305, 360	257	
5 El Kasr									100	220, 245	378		
6 El Awama											82		
7 AT 1									348		82		
8 AT 58								218, 220	177		95, 96	149, 150	
9 AT 40			65, 72, 75					243				161, 163	134
10 AT 42	233		72, 75				139						
11 AT 10													
12 AT 11		380, -400, 460				314			93		82		
13 AT 25			186			314		243					
14 AT 26		-76, 380, 400, 460	- 65, 75			314					96		
15 AT 4				345		405		268, 380					
16 AT 6				345						440		257	
17 AT 3		238		145		405							
18 AT 22			223									100, 103	
19 AT 5	100	60, 91							124		97, 98		
20 AT 29		91				283	139	188				103, 111, 114, 149, 150	193
21 AT 15					136, 138		110		135		82	65	
22 AT 20					108, 110, 136, 138		110, 158, 160		85, 93				
23 DT 1	100, 179				108, 110, 136, 138		110, 158, 160		85, 93				
24 DT 2					108, 110, 136, 138		110, 158, 160		93, 124, 135			65	

amongthem. The same observation was true for landraces collected from Marsa Matrouh and Agricultural Research Center (ARC). The two lines AT 1 (7) and AT 58 (8) belonging to ARC were grouped in cluster 1 with native landraces of Marsa Matrouh. Also, it was observed that some lines such as DT 1 (23) and DT 2 (24), previously known as tolerant and sensitive to salt stress, respectively are grouped together in one subcluster. Similarly the two lines AT 42 (10) and AT 40 (9) (susceptible to rusts) were grouped together.

3.5 Correlation between molecular analysis and biological evaluation

When the results of the molecular analysis are considered with respect to the resistance of different landraces to net blotch and leaf rust, one can notice from data in Table 1 and Figure 2, that Rafah and Awlad Ali (extremely resistant landraces) were grouped together in cluster 1 and the second two extremely resistant lines (DT 1 (23)

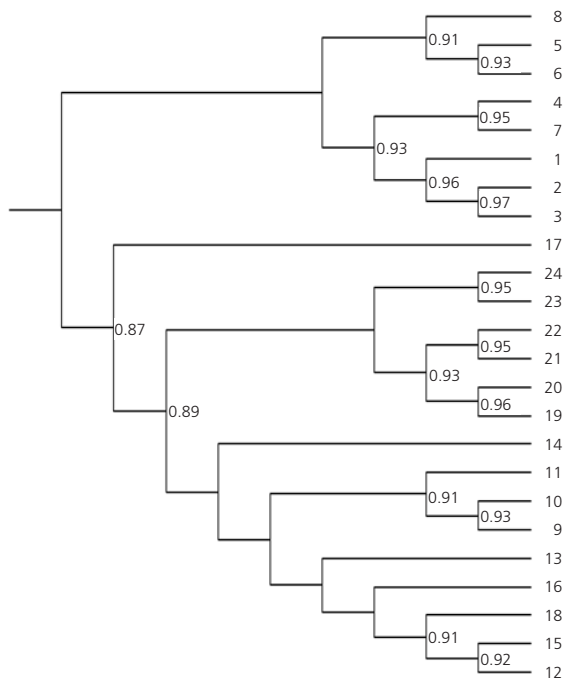


Figure 2:
AFLP -based dendrogram of the twenty four Egyptian barley landraces and lines

Table 5:
Distribution of selected polymorphic AFLP bands between leaf rust resistant and susceptible barley lines

Primer comb. code	Resistant		Susceptible		Size of polymorphic bands
	AT 1	AT 58	AT 40	AT 42	
1 / 5	-	-	+	+	70, 71
2 / 5	-	-	+	+	84, 128, 132, 165
2 / 7	+	+	-	-	142
3 / 7	-	-	+	+	146
3 / 3	-	-	+	+	128, 129, 130
4 / 2	-	-	+	+	270
4 / 5	+	+	-	-	189
5 / 3	+	+	-	-	125
5 / 7	+	+	-	-	79, 80, 200
	-	-	+	+	440
6 / 7	-	-	+	+	140
6 / 8	+	+	-	-	273
	-	-	+	+	178
6 / 3	-	-	+	+	122, 168, 170
	+	+	-	-	140
7 / 8	+	+	-	-	93
8 / 2	+	+	-	-	119, 120, 155, 156
8 / 3	+	+	-	-	235
8 / 6	-	-	+	+	174
8 / 7	+	+	-	-	273
	-	-	+	+	178
5 / 4	-	-	+	+	72, 75

Table 6:

Distribution of selected polymorphic AFLP bands between net blotch resistant and susceptible barley lines

Primer comb. code	Resistant		Susceptible		Size of polymorphic bands
	AT 4	AT 6	AT 3	AT 22	
1 / 8	+	+	-	-	60, 75, 107, 108, 110, 127, 128, 129, 131, 189
2 / 5	+	+	-	-	128, 132, 167, 265, 310, 345
2 / 7	+	+	-	-	80
2 / 8	-	-	+	+	315
3 / 3	-	-	+	+	350
3 / 7	-	-	+	+	190
4 / 5	-	-	+	+	174, 175, 185, 215, 310, 330, 340
4 / 7	+	+	-	-	120, 152, 209
5 / 7	-	-	+	+	122
5 / 3	+	+	-	-	79, 375
6 / 3	-	-	+	+	129, 133, 140, 300, 340, 430, 180, 182
6 / 7	-	-	+	+	275, 285, 340, 345, 350, 365, 370, 420, 425, 430, 433, 480, 490
6 / 8	-	-	+	+	83, 184, 240
7 / 3	-	-	+	+	145, 155, 172, 175
7 / 5	-	-	+	+	185, 187, 200, 700, 900, 1000
7 / 8	-	-	+	+	325, 375
8 / 2	+	+	-	-	158, 159, 160, 165, 167, 170, 290, 292
8 / 3	-	-	+	+	120, 122, 123, 142, 250, 262
8 / 6	-	-	+	+	490
8 / 7	-	-	+	+	170, 185

and AT 5 (19)) were clustered together in subcluster 1 belonging to cluster 2. The two lines grouped together with native landraces in cluster 1 were also resistant to leaf rust. These observations encouraged us to analyze the results of molecular analysis of crosses (lines) developed from the same parents and previously identified as resistant (R) and susceptible (S) to leaf rust and net blotch in the light of resistance and susceptibility, and absence and presence of unique markers (Table 5 and 6). Because each two groups of plants subjected to comparison having the genetic make up except resistance and susceptibility, so somebody has to expect some degree of linkage between markers and resistance or susceptibility and some of the mentioned markers herein can be useful for future mapping of resistance genes.

4 Discussion

Net blotch (*Pyrenophora teres*) and leaf rust (*Puccinia hordei*) are serious diseases of great negative impact on barley and cereals production in Egypt. Therefore, biological and molecular evaluation of any new native barley germplasm is vital to enrich our knowledge on the abilities of existing germplasms and enabling us to predict hybrid performance, select parents for crossing in crop improvement programmes, and clone new natural plant resistance genes (Saker, 2005 a and b Saker et al., 2005). The most interesting and striking output of the biological evaluation part of this study is the resistance of some line and landraces to net blotch and leaf rust. Also, the level of resistance is varied from extreme resistance to high and moderate resistance. This conclusion was reported by other investigators in barley against leaf rust (Mamadov et al., 2003) and net blotch (Weiland et al., 1999 and Raman et al., 2003).

Based on this observation, it can postulated that such lines and landraces have a genetic make up enabling them to resist different types of fungal diseases. It is well-known that invasion of plant cells by one pathogen stimulate the expression of a set of resistance genes involved in resistance. This postulation is quite acceptable because some of susceptible lines are susceptible to net blotch and leaf rust also. The variations in the level of resistance recorded herein confirm the involvement of more than one gene in net blotch and leaf rust resistance (Ho et al., 1996; Steffenson et al., 1996).

Regarding the AFLP analysis, the percentage of polymorphism (4.8 %) detected in the present study is very low compared with previously published AFLP analysis of barley, which ranged from 21 % (Saker, 2005a) to 61.3 % (Maheswaran et al., 1997) and 77 % (Saker et al., 2005). This lowest polymorphism is due to the narrower genetic pools of different genotypes and landraces under investigation, especially 18 lines out of the 24 landraces were developed from common ancestors. The rest of landraces were grown by Bedouins in completely isolated area in Sinai and Marsa Matrouh, so high degree of genetic similarity within the group could be expected. However, the lowest polymorphism may also be attributed to the used primer combinations and/or scoring method followed in this study, only reproducible and distinct bands were scored, meanwhile weak and ambiguous bands were excluded (Vos et al., 1995). In this context, Russel et al. (1997) reported high genetic similarity (0.924) within the spring types of barley.

The clustering patterns of AFLP-based dendrograms of the investigated landraces agree with the origin of different groups of lines and landraces depending on its pedigree and resistance traits. Therefore, the use of AFLP

analysis in barley is highly recommended to reveal genetic diversity in genetically close genotype and landraces (Saker et al., 2006). In this context, Saker et al. (2005a) indicated that the Egyptian barley genotypes have probably originated from closely related ancestors and possess high degree of genetic similarity. Also they concluded that AFLP can be applied to differentiate closely related genotypes of the same origin. The same conclusion is derived from the RFLP data of Clegg and Brown (1984) who concluded that variability is lower in cultivated barley than in wild barley, possibly as a result of domestication.

It could be concluded that new promising resources for resistance to net blotch and leaf rust were recorded in Egyptian barley germplasm. The outcome of this study indicated that molecular analysis combined with biological evaluation has proved to be a promising strategy in the selection of disease resistant germplasm, as previously reported by Haley et al. (1993). Extensive investigations on pest resistance genes in barley have led to the identification of about 107 resistance genes (Chelkowski et al., 2003).

Acknowledgement

This work was kindly funded by the National Strategy for Biotechnology and Genetic Engineering program (contract no. 58). The program is administered by Science and Technology Center at the Academy of Scientific Research and Technology, Egypt.

References

- Chelkowski J, Tyrka M, Sobkiewicz A (2003) Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers. J Appl Genet 44:291-309
- Clegg MT, Brown AHD (1984) White field chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley : implications for genetic conservation. Genet Res Cambridge 43:339-343
- Czembor J (2001) Resistance to powdery mildew in barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces from Egypt. Plant Genetic Resources Newsl 123:52-60
- Finckh M, Gacek E, Gzembar H, Wolfe S (1999) Host frequency and density effects on powdery mildew and yield in mixtures of barley cultivars. Plant Pathol 48:807-816
- Haley S, Miklas P, Stavely J, Kelly D (1993) Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theor Appl Genet 86:505-512
- Ho M, Tekauz A, Choo M, Martin A (1996) Genetic studies on net blotch resistance in a barley cross. Can J Plant Sci 76:715-719
- Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp S (1997) Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm : genetic diversity among oil seed inbred lines. Theor Appl Genet 95:400-407
- Mamadov JA, Zwonitzer JC, Biyashev RM, Griffey CA, Jin Y, Steffenson BJ, Saghai Maroof MA (2003) Molecular mapping of leaf rust resistance Gene Rph5 in barley. Crop Sci 43:388-393
- Maheswaran M, Subudhi S, Nandi S, Xu J, Parco A, Yang D, Huang N (1997)

- Polymorphism, distribution and segregation of AFLP markers in a double haploid rice population. *Theor Appl Genet* 94:39-45
- Martin A (1985) Disease progression and yield loss in barley associated with net blotch, as influenced by fungicide seed treatment. *Can J Plant Pathol* 7:83-90
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Proram J, Powell W, Waugh R (1997) Comparison of PCR based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed* 3:127-136
- Nachtigall M, Saker M, Kopahnke D, Walther U (2000) Development of molecular markers in barley against fungal resistance. *Ber Arbeitstag Vereinigung Österreichischer Pflanzenzüchter* 51
- Oerke E, Dehne H, Schönbeck WF, Weber A (1994) Crop production and crop protection : estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam : Elsevier, 808 p
- Paul S, Wachirg FN, Powell W, Waugh R (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan Tea (*Camellia sinensis* L.) (O. kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet* 94:225-263
- Raman H, Platz GJ, Chalmers K, Raman R, Barr A, Moody DB (2003) Mapping of genomic regions associated with net blotch resistance in barley. *Aust J Agric Res* 54:11-12
- Russel JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoar A, Powell W, Waugh R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95:714-722
- Saker MM (2005a) Biological and molecular characterization of some Egyptian barley genotypes resistant to net blotch disease. *Cell Mol Biol Lett* 10:265-280
- Saker MM (2005b) Mapping RAPD and SSR markers linked to net blotch resistance gene in barley. *Arab J Biotechnol* 8(2):369-378
- Saker MM, Nachtigall M, Kuehne T (2005) A comparative assessment of DNA fingerprinting by RAPD, SSR and AFLP in genetic analysis of some barley genotypes. *Egypt J Genet Cytol* 34:81-97
- Saker MM, Adawy SS, Smith M (2006) Entomological and genetic variation of cultivated barley (*Hordeum vulgare*) from Egypt. *Arch Phytopathol Plant Protect* 13(12):1-11
- Shipton A, Kahn N, Bayd RL (1973) Net blotch of barley. *Rev Plant Pathol* 52:269-290
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy : the principles and practice of numerical classification. San Francisco : Freeman, 573 p
- Stam P (1997) Molecular markers : a useful tool for crop improvement via introgressive breeding. Wageningen Plant Breeding Research Theme 3
- Steffenson J, Hayes P, Kleinhofs A (1996) Genetics of seeding and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theor Appl Genet* 92:552-558
- Struss D, Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97:308-315
- Tingey V, Del Tufo P (1993) Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol* 101:349-352
- Vos P, Mogers RM, Bleeker M, Reijans T, Vande L, Hornes M, Frijters A, Port J, Peleman J, Kliper M, Zabeau M (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23:4407-4417
- Weiland JJ, Steffenson BJ, Cartwright RD, Webster RK (1999) Identification of molecular genetic markers in *Pyrenophora teres* f. *teres* associated with low virulence on 'Harbin' barley. *Phytopathol* 89:176-181
- Yang X, Quiros C (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86:205-212
- Zohary D, Hopf M (1988) Domestication of plants in the old world : the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. Oxford : Clarendon, pp 241-259

Preliminary phytochemical and propagation trial with *Salvadora persica* L.

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Salah Sayed Ahmed¹, Soaad Esmaeil Essawy El-Gengaihi¹, Mohamed El-Sayed Ibrahim¹ and Ewald Schnug²

Abstract

Seeds of *Salvadora persica* L. ("toothbrush tree" or "siwak") were collected from wild plants grown at Gabal Elba a mountain in East South Egypt on the coast of the Red Sea. The seeds germinate after one month. Phytochemical screening revealed the occurrence of carbohydrates and/or glycosides, sterols, terpenes, flavonoids and alkaloids.

The alcohol extract possesses antimicrobial activity against *Proteus vulgaris*. The herb contained 0.16 % volatile oil from which heptadecene γ -carbonic acid is the major. In a protocol for *in vitro* propagation of *S. persica* L. MS medium supplemented with 0.5 of each NAA and BA gave the best results for proliferated shoots and MS supplemented with IBA for rooting.

Keywords: *Salvadora persica* L., germination, antimicrobial, *in vitro* propagation.

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Phytochemie und Vermehrung des Zahnbürstenbaums (*Salvadora persica* L.)

Samen von *Salvadora persica* L. ("Zahnbürstenbaumes" oder "Siwak") wurden von Wildbeständen in der Gebirgsregion "Gabal Elba" an der Küste des Roten Meeres im Südosten Ägyptens gesammelt. Die Samen keimten nach einem Monat. Ein Screening der phytochemischen Zusammensetzung wies Kohlenhydrate, Glycoside, Sterole, Terpene, Flavonoide und Alkaloide nach. Der alkoholische Extrakt erwies sich als antiseptisch wirksam gegen das Fäulnisbakterium *Proteus vulgaris*. Die krautigen Pflanzenteile enthielten 0,16 % flüchtige Öle, deren Hauptbestandteil Heptadecen γ -Karbonsäure war. Die *in vitro* Vermehrung von *Salvadora persica* L. war bei Schösslingen am erfolgreichsten auf einem MS Medium mit Zusatz von jeweils 0,5 mg/l NAA und BA und bei Wurzeln auf einem MS Medium mit Zusatz von IBA.

Schlüsselwörter: *Salvadora persica* L., Keimung, antimikrobiell, *in vitro* Vermehrung.

¹ National Research Centre, Department of Cultivation and Production of Medicinal and Aromatic Plants, Dokki 12311, Cairo/Egypt; Email: salahs_1942@yahoo.com

² Julius Kuehn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig/Germany

1 Introduction

The tooth brush tree *Salvadora persica* L. is a small tree or shrub with a crooked trunk, seldom more than one foot in diameter, bark scabrous and cracked, whitish with pendulous extremities. The root bark of the tree is light brown and the inner surface are white. Its odor is like cress and taste is warm and pungent. Its fibrous branches have been used as tooth brushes by many Islamic communities, and are called "siwak". It was recommended to be used before every prayer. The users of siwak have shown a remarkable lack of tooth decay when compared with other tooth sticks and no tooth cleaning at all (El-Batanony, 1999). Today siwak is also sold in western countries as a natural means for teeth maintenance. A 5 - 8 cm long piece of the root is chewed until frayed and resembling a small brush (Figure 1).



Source: Manufactum, 2009.

Figure 1:
Frayed stick of *Salvadora persica* L.

Chemically, the air dried stem bark of *S. persica* is treated with 80 % alcohol and then with ether and other solvents which showed that it is composed of alkaloid may be salvadurine, tannins, saponins, flavonoids and sterols (El-Sadhan and Almaz, 1999). It has been reported that *S. persica* L. contains substances that possess antibacterial properties, which encourage some tooth paste manufacturers to incorporate powdered stems and or root material of siwak in their products.

In Egypt there are few plants concentrated in Gabal Elba a mountain in East South Egypt on the coast of the Red Sea, at the border between Egypt and Sudan. As this plant is endangered, so this study aims to propagate and sustain propagation of this plants by ordinary cultivation or by using *in vitro* propagation. In addition, a preliminary phytochemical and antimicrobial investigation of the alcohol extract of the herb were performed. In India, it is important to local people because of its oil yielding, pharmaceutical, fuel, and fodder value and small but edible fruits (Ramoliya et al., 2004).

2 Materials and methods

Seeds of *Salvadora persica* L. were collected from plants grown in the region of Gabal Elba on December 2005 and were sown in peat moss pots on autumn 2006. The seeds germinated after one month and the seedlings were kept in a green house. Shoot tips were obtained for tissue culture propagation. Mature plants collected from the Sermetay vally in the same region were distilled with water to retrieve the volatile oil. The oil obtained was analysed by gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) employing the conditions given in Tables 1 and 2.

Table 1:
Settings for standard gas chromatography

Instrument	Hewlett Packard 5890 Series 11 Plus
Column	50 meter Carbowax Hewlett Packard Capillary, Int. diameter 0.32 mm Film thickness 0.33 µm
Sample size	0.3 µl.
Oven temperature	60 to 200 °C
Program rate	3 °C/min
Injection port temp	150 °C
Detector (FID)	250 °C
Carrier gas	Helium
Carrier gas flow rate	1 ml/min
Split ratio	1:100
Attenuation	3

Table 2:
Settings for gas chromatography mass spectrometry

Column	Hewlett Packard Capillary Column 50 meter Carbowax Int. diameter 0. 2 mm Film thickness 0.33 µm
Sample size	0.5 µl
Oven temperature	40 to 200 °C
Injection temp	150 °C
Detector (FID)	TIC
Carrier gas	Helium
Carrier gas flow rate	1 ml/min
Split ratio	1:100
MS ionization voltage	70 eV
Start, Stop masses	35 - 400
Electron multiplier voltage	1800 eV

Identification of the volatile oil constituents was performed by matching with the Welly library of the MS apparatus (data reported in Adams, 1995) and in the Eight-peak Index of mass spectra 1974.

Phytochemical screening for the *S. persica* L. plants has

been carried out according to the method of Harborne (1997). The antimicrobial test for alcohol extract was adopted using the method of Abou Zeid and Schatu (1969).

3 Tissue-culture conditions

The shoot tips of *S. persica* L. were surface sterilized with 70 % ethanol for 1min. followed by 20 % commercial chlorox (contained 5.25 sodium hypochlorite) for 20 minutes. After three successive rinses in sterile distilled water the explants (about 0.25 cm in length) were placed in glass tubes containing 20 ml of MS (Murashige and Skoog, 1962; USDA, 2007) basal medium supplemented with 30 g/l sucrose, 100 mg/l myo-inositol and solidified with 7 g/l agar.

Four concentrations of the cytokinin BA (0.25, 0.5, 1, 2 mg/l) in combination with 0.5 mg/l NAA as auxin were added to the media prior to autoclaving (121 °C and a pressure of 1.2 kg/cm² for 20 min) and the pH was adjusted to 5.8 (using 1 M NaOH or HCL).

After 4 weeks the produced shoots were excised from proliferating shoot cultures and placed on MS medium supplemented with 0.5 mg/l each of NAA (α -naphthaleneacetic acid) and BA (6-benzyladenine) as the best medium in starting stag. For rooting shoots were transferred (after 30 days of cultivation) to MS medium supplemented with different concentrations of IBA (indolebutyric acid; 0.0, 1, 2 and 3 mg/l). All cultures were maintained in a growth chamber at 25 $\pm$ 2 °C under a 16-h photoperiod (irradiance of about 40 μ mol⁻² s⁻¹ provided by cool white fluorescent lamps).

4 Results and discussion

4.1 Seed germination

Seeds of *Salvadora persica* L. were collected from plants wildy grown at Gabal Elba. The seeds were sown in peat moss pots 20 cm in diameter in the experimental garden of the National Research Center. The seeds germinated after one month. Each pot contained from 1 - 4 seeds

which after successful germination, were thinned to only one plant after emergence of the second leaf, then all pots were transferred to the green house to complete growth.

The phytochemical screening revealed that the herbaceous parts of *Salvadora persica* L. contained carbohydrates, glycosides, sterols, terpenes, flavonoids, tannins, alkaloids and but were deprived of saponins, coumarins and anthraquinons.

The antimicrobial activity of alcoholic extracts of herbaceous parts of *S. persica* L. revealed a higher inhibition zone to *Proteus vulgaris* amounted to 12.00 mm, in addition to the acidity of the sap of herb that reached 6.53, which confirms *S. persica* L. contains substances with antibacterial properties.

In this context it was reported that *S. persica* L. contained high amounts of fluorides and silica which had an important role in oral hygiene. Another investigation proved that siwak and other tree twigs could act as an effective tool in removal of soft oral deposits.

The herbaceous parts of siwak plants were hydrodistilled using a Clevenger apparatus and the amount of volatile oil retrieved was 0.16 %. The oil obtained was dried over anhydrous sodium sulphate and then injected to GLC with the conditions described in Tables 3 and 4. The result obtained revealed the presence of different monoterpene compounds, hydrocarbons and oxygenated derivates beside some short chain fatty acids.

The different constituents are compiled in Table 5 which indicate that the major constituent of the oil is heptadecene 8- carbonic acid, which amounted to 39.24 % followed by indole- (18.2 %) and hexadecanoic acid (13.4 %).

4.2 In vitro propagation of *Salvadora persica* L.

A protocol is established to regenerate *Salvadora persica* L. using shoot tip explants. These shoot tips were surface sterilized with 70 % ethanol for 1min, followed by 20 % commercial chlorox (5.25 sodium hypochlorite) and the procedure was completed as described in material and methods.

Table 3:
Phytochemical screening of herbaceous parts of *Salvadora persica* L.

Carbohydrates and/or glycosides	Sterols & terpenes	Flavonoids	Tannins	Alkaloids	Saponins	Coumarins	Anthraquinone
+	+	+	+	+	-	-	-

Table 4:
Inhibition zone of alcoholic extracts of *Salvadora persica* L. to some organisms

pH	B.subtilis	E.coli	Chromobacter sp.	Pseudomonas fluorescens	Lactobasillis breveis	Proteus vulgaris	Staphilococcus aureus	Salmonella typhi	Candida albicans	Aspragillus niger
6.53	-	-	-	-	±	12.00	-	-	-	-

Table 5:

Qualitative analysis of volatile oil from *Salvadora persica*

Peak	Compounds	Rt. (min)	Area %
4	D-Limonene	21.574	0.77
6	Linalool	22.560	0.57
7	Benzaldehyde	23.00	0.29
8	Linalyl acetate	23.70	0.63
10	E-2-decanal	25.89	0.17
11	2-Undecanone, 6-10-dimethyl	26.71	0.24
12	Delta.(7)-Methanone-2	27.37	0.34
13	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethanyl)	28.64	1.07
15	β -Damascenone	30.62	0.21
16	5,9-Undecadien-z-one, 6-10-dimethyl	30.97	0.54
17	α -Ionone	31.35	0.24
19	Indole	33.38	18.20
22	Hedycaryol	36.15	0.53
23	2-Pentadecanone, 6-10,14-trimethyl	36.79	3.10
25	Nonanoic acid	37.53	0.36
30	(-), Delta-selinene	40.22	0.08
31	β -Eudesmol	40.57	0.35
32	Tricosane	40.77	0.24
34	Dedecanoic acid	47.72	0.41
36	2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetramethyl	54.23	0.53
37	Octadecanoic acid	55.76	8.29
39	Nonadecane	59.26	0.14
41	Tetra dedecanoic acid	59.79	0.68
42	9-Octadecanoic acid	62.05	0.21
43 - 58	Heptadecene-8-carbonic acid	62.09 - 63.99	39.14
54 - 78	9,12-Octa dedecenoic acid	76.70 - 78.29	3.50
79 - 80	Hexadecanoic acid	80.24	13.40

Table 6 represents the effect of different concentrations of auxins as NAA and kinetin as BA on proliferation of shoots.

From the previous table, it was observed that MS medium supplemented with 0.5 of each of NAA and BA gave the best result for number of proliferated shoots. For rooting of shoots, it were excised and transferred to MS medium supplemented with different concentration of IBA of 0.0, 1, 2 and 3 mg/L. All cultures were maintained in a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 16 h photoperiod.

After one month shoots were rooted in a MS medium supplemented with 3mg/L IBA. Table 7 shows that the MS medium supplemented with 3mg/L IBA followed by MS media containing 2.0 mg/L BA provided the optimum conditions for rooting.

Rooted shoots were transferred to pots containing peat moss and sand in a ratio of 1:1. The plantlets were covered with plastic bags and incubated in the growth cham-

Table 6:

Effect of different concentrations of NAA and BA on proliferation of *Salvadora persica* L. shoots

Growth regulators concentration (mg/l)	No. of shoots	Shoot length (cm)	Time of shoot initiation (days)
0.5 (NAA) + 0.25 (BA)	5.0 ± 0.1	2.0 ± 0.09	10
0.5 (NAA) + 0.50 (BA)	20 ± 0.2	7.0 ± 0.3	8
0.5 (NAA) + 1.0 (BA)	15 ± 0.3	4.0 ± 0.1	7
0.5 (NAA) + 2.0 (BA)	18 ± 0.2	3.0 ± 0.2	7

Table 7:

Effect of different concentrations of IBA on rooting of proliferated shoots of *Salvadora persica* L.

IBA concentration (mg/l)	No. of roots	Root length (cm)	Time of roots initiation (days)
0.0	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.09	20
1.0	--	--	--
2.0	1.0 ± 0.3	4.0 ± 0.1	25
3.0	4 ± 0.2	6.0 ± 0.2	15

ber for one month. After one month these plants were transferred to the green house to complete their growth until flowering. In conclusion to this investigation, the endangered *Salvadora persica* L. plant can be propagated by seeds collected from wild grown plants if available. The second choice to propagate this plant is by tissue culture which simply adopted, however the plant needs time for ordinary or *in vitro* propagation.

References

- Abou-Zeid AA, Shehata Y (1969) A simple technique for assaying antibiotics using a methylene as an indicator. *Ind J Pharmacy* 31:72-75
- Adams RP (1995) Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy. Carol Stream : Allured Publ, 469 p
- Mass Spectrometry Data Center (1974) Eight-peak index of mass spectra. Reading, UK
- El-Batanony K, Abou Tabl E, Shabana M, Soliman F (1999) Wild medicinal plants in Egypt. Cairo : Palm Press
- El-Sadhan R, Almaz K (1999) Miswak : a cultural and scientific heritage. *Saudi Dental J* 11(2):80-87
- Harborne JB (1998) Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis. London : Chapman & Hall, 302 p
- Manufactum (2008) Siwak-Wurzel [online]. Zu finden in <<http://www.manufactum.de/Produkt/0/1404974/SiwakWurzel>> [zitiert am 11.03.2008]
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3):473-497
- Ramoliya PJ, Patel HM, Pandey AN (2004) Effect of salinization of soil on growth and macro- and micro- nutrient accumulation in seedlings of *Salvadora persica*. *Forest Ecol Manage* 202:181-193
- USDA / National Center for Genetic Resources (2007) Medium Recipes [online]. Zu finden in ><http://www.ars-grin.gov/ncgrp/media.htm>< [Zitiert am 11.03.2008]

Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants

Paper presented at the workshops "Better Plants for Better Life" conducted during the German/Egyptian Year of Science and Technology 2007 at ARC in Cairo/Egypt and FAL in Braunschweig/Germany

Dirk Selmar¹

Abstract

It is well known that spices derived from plants grown under mediterranean or semi-arid climate conditions, respectively, are much more pronounced in taste and are more aroma intensive than those obtained from equivalent plants, but cultivated in moderate climate, e.g. in Central Europe. Analogous quality differences are observed with regard to medicinal plants, i.e. the content of the relevant secondary plant products in general is less in plants grown in a moderate Atlantic climate than in those derived from semi-arid regions. Based on plant physiological considerations, this phenomenon can be explained easily: in semi arid regions - due to limited water supply and much higher light intensities - the plants are exposed to a significant higher drought stress than the plants grown in Central Europe.

Unfortunately, in the literature only very limited data on these obvious coherences are available. This review is aimed to compile the corresponding data published so far. In most cases, comparative analyses revealed that the content of secondary plant products indeed is higher in plants that suffer drought stress than in those cultivated under optimal conditions.

Under stress, a strong oversupply of reduction equivalents is generated. In order to prevent damage by oxygen radicals, NADPH + H⁺ is reoxidized by photorespiration or violaxanthine cycle. Yet, the high concentration of reduction equivalents also leads to a stronger rate of synthesis of highly reduced compounds, i.e. isoprenoids, phenols or alkaloids.

Unfortunately, these coherences have not been considered adequately neither in general plant physiology nor in reflection of medicinal or spice plants. In this review, a basis for further considerations of the physiology and biochemistry of secondary plant metabolism is presented. Special emphasis is put on aspects of quality improvement by increasing the concentration of secondary compounds in spices and medicinal plants by deliberately applying drought stress.

Keywords: *drought stress, salt stress, secondary plant products, medicinal plants, spice plants, quality improvement*

Zusammenfassung

Steigerung des Gehaltes an Sekundärstoffwechselprodukten in Gewürz- und Arzneipflanzen durch Salz- und Trockenstress

Gewürze aus Pflanzen, die in Südeuropa oder in semi-ariden Gebieten angebaut wurden, sind stets aromatischer als Produkte, die von Pflanzen stammen, die in gemäßigten Klimaten gewachsen sind. Ähnliche Qualitätsunterschiede finden sich auch bei Medizinalpflanzen, bei denen die Gehalte an relevanten Naturstoffen deutlich niedriger sind, wenn die Pflanzen in moderatem Klima kultiviert wurden. Aus pflanzenbiologischer Sicht lässt sich dieses Phänomen leicht erklären: in trockenen Gebieten sind die Pflanzen aufgrund der begrenzten Wasserversorgung und den höheren Lichtintensitäten meist einem größeren Trockenstress ausgesetzt als in Mitteleuropa.

Leider wurde dieser Bezug in der wissenschaftlichen Literatur bislang kaum beachtet, und es gibt nur wenige Arbeiten, die diese Thematik berücksichtigen. Die Sichtung der bislang publizierten Daten zeigt, dass die Sekundärstoff-Gehalte in den meisten Pflanzen tatsächlich höher sind, wenn sie Trockenstress ausgesetzt waren.

Stress führt zu einem Überangebot an NADPH + H⁺; dieses wird - um eine Schädigung durch Sauerstoff-Radikale zu vermeiden - durch Photorespiration oder den Violaxanthin-Zyklus effektiv re-oxidiert; dennoch führt das hohe Reduktionspotential zur vermehrten Synthese reduzierter Verbindungen wie Isoprenoiden, Phenolen oder Alkaloiden.

Leider wurden diese Zusammenhänge bislang noch nicht adäquat bei wissenschaftlichen Arbeiten zum Sekundärstoffwechsel oder über Arzneipflanzen berücksichtigt. In diesem Review wird, aufbauend auf einer Literaturübersicht, die Basis für eine weiterführende pflanzenphysiologische Bearbeitung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels vorgestellt. Eine besondere Aufmerksamkeit kommt dabei der Qualitätsverbesserung pflanzlicher Produkte durch gezielte Steigerung der Sekundärstoff-Konzentrationen in Gewürz- und Arzneipflanzen durch bewussten Einsatz von Trockenstress zu.

Schlüsselwörter: *Trockenstress, Salzstress, sekundäre Pflanzenstoffe, Medizinalpflanzen, Gewürzpflanzen, Qualitätssteigerung*

¹ Technical University of Braunschweig, Institute of Plant Biology, Humboldtstrasse 1, 38106 Braunschweig/Germany; Email: d.selmar@tu-bs.de

1 Introduction

It is well known that spices that are derived from plants grown under mediterranean or semi-arid climate conditions are much more pronounced in taste and more aroma-intensive than those obtained from equivalent plants, but cultivated in a moderate climate, i.e. in Central Europe. Analogous quality differences could be observed with regard to medicinal plants: the content of the corresponding relevant secondary plant products in general is less in plants grown in a moderate Atlantic climate than in those derived from semi-arid regions. Obviously, the different growth condition must have a significant impact on the synthesis and accumulation of secondary plant products. In this context, there are various hints that stress reactions, especially corresponding responses to salt and drought stress might be responsible for the increase or decrease in the content of relevant natural products. However, despite this obvious conjuncture, corresponding research with respect to the scientific background is rare or even still lacking. This article gives an overview on the various effects of drought and salt stress, presents various aspects of the biochemical and plant physiological background of this phenomenon and tries to give a solid explanation for it.

2 Drought and salt stress - general aspects

In general, the atmospheric CO_2 -concentration is limiting photosynthesis. Yet, when this maximum photosynthetic rate should be achieved, CO_2 influx must be maximal, i.e. by opening the stomata. This however - due to the corresponding high evaporation rates - results in a severe loss of water, which - at least in all water limiting habitats - would lead to desiccation processes. Consequently, plants react with partial stomata closure. As result of this compromise between maximization of photosynthesis and minimization of water loss, the imbalance between the delivery of reductions equivalents ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) by photosynthetic electron chain and their consumption by CO_2 -fixation via Calvin cycle is even higher than under "normal" CO_2 -limiting conditions. The consequence of such over-reducing status is the production of various oxygen radicals that are formed via pseudo-cyclic electron transport (Figure 1), known as Mehler reaction (e.g. Hideg et al., 1995; Chen et al., 2004). Yet, at ambient, standard conditions, general protective mechanisms i.e. photorespiration (Smirnoff, 1993; Wingler et al., 2000) and the xanthophyll cycle (Lin et al., 2002; Latowski et al., 2004) are able to re-oxidize the $\text{NADPH} + \text{H}^+$ which is overproduced by the electron transport chain and thus suppressing the generation oxygen radicals. Under stress condition, however, over-reduction of the electron transport chain reaches the level, where electron flow to oxygen is inevi-

table (Smirnoff, 1993; Chen et al., 2004). Consequently, superoxide radicals are produced which easily react subsequently to further various toxic oxygen species, i.e. hydroxyl radicals (Jakob & Heber, 1996). In order to detoxify these toxic oxygen species, during evolution, plants have acquired an effective detoxification system. Radicals are scavenged by the action of superoxide dismutase (SOD) that produces hydrogen peroxide which subsequently is reduced by ascorbate to water, catalyzed by the ascorbate peroxidase (e.g. Smirnoff, 1993; Shalata et al. 2001).

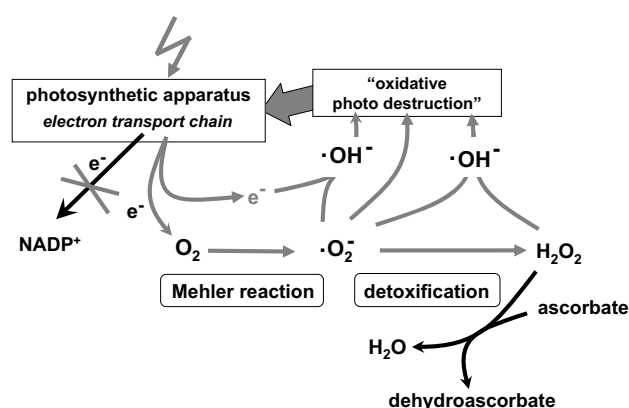


Figure 1:

Scheme of oxidative photodestruction by reactive oxygen species (Mehler reaction). In a highly over-reduced status, the entire pool of NADP^+ is reduced to $\text{NADP} + \text{H}^+$ and is not available as electron acceptor. As result, the electrons driven by photosynthetic electron chain, are transferred to molecular oxygen (Mehler-reaction or pseudocyclic electron transport) to yield superoxide, which might react with further electrons to hydroxyl radicals. Generally, superoxide is disproportionized by the action of superoxide dismutase to molecular oxygen and hydrogen peroxide, which subsequently is detoxified by ascorbate peroxidase.

When plants are growing on soils, where the negative water potential is caused by high salinity, they are severely affected by the corresponding high osmotic pressure. In addition to the water limiting effects resulting from drought stress, the cells have also to deal with the high osmotic pressure. Apart from soils with original or genuine salinity, many soils in arid regions of the world are oversalted due to excessive irrigation. Current estimates indicate that 10 - 35 % of the world's agricultural land is now affected, with very significant areas becoming unusable each year (for review see e.g. Yokoi et al., 2002; Parida & Das, 2005). As pointed out for the drought stress response, also the plants suffering from salt stress have to cope with the production of toxic oxygen species. Thus, the free radical scavenging and detoxification reactions are typical metabolic events for these plants. Moreover, they have to adjust the osmotic potential, which generally is achieved by accumulation of compatible osmolytes and osmoprotectants (for review see e.g. Hasegawa et al., 2000; Bohnert et al., 1995).

3 Production of secondary plant products under stress conditions

As outlined above, the concentrations of various secondary plant products are strongly depending on the growing conditions and it is obvious that especially stress situations have a strong impact on the metabolic pathways responsible for the accumulation of the related natural products. Yet, corresponding comparative analyses have to cope with the fact that mostly more than one environmental factor are different in corresponding traits, e.g. increase in light intensity mostly is entailed with elevated temperatures or a lower water availability, and drought conditions often are correlated with higher salt concentrations in the soil. Indeed, in many studies the corresponding results are not conclusive; nevertheless - when thoroughly reviewing the literature - decisive deductions for the effects of drought and salt stress on the accumulation of secondary plant products can be made. In a whole array of experiments it could be shown that plants which are exposed

to drought stress indeed produce higher amounts of secondary metabolites. This counts for phenols and terpenes as well as for nitrogen containing substances, such as alkaloids, cyanogenic glucosides, or glucosinolates respectively (Table 1a and 1b). There is no doubt that the application of drought stress enhances the concentration of secondary plant products. However, it has to be taken into consideration that especially drought stress also reduces the growth of most plants. Consequently, it could not be excluded that the putative increase in concentration of secondary plant products in comparison to non-stressed plants just results from the fact that the total amount of secondary metabolites per plant is more or less the same in both traits whereas the biomass is significantly lower in the stressed plants.

Unfortunately, in most of the studies, no data on the overall biomasses of the plants analysed are given. Indeed, in most cases this lack of information is not due to incomplete analyses or superficiality, but it could be ascribed to the fact that only some special plant parts - i.e. roots,

Table 1a:

Drought stress entails a concentration increase of various secondary plant products: phenols and terpenes

chlorogenic acid	<i>Helianthus annuus</i>	massive increase (tenfold)	Del Moral, 1972
total phenols	<i>Echinacea purpurea</i>	strong increase (67 %)	Gray et al., 2003
total phenols	<i>Prunus persica</i>	higher content in stressed plants	Kubota et al., 1988
phenolic compounds	<i>Thymus capitatus</i>	higher content in stressed plants	Delitala et al., 1986
total phenols	<i>Hypericum brasiliense</i>	strong increase (over 80 %)	deAbreu & Mazzafera, 2005
rutine	<i>Hypericum brasiliense</i>	massive increase (about fivefold)	deAbreu & Mazzafera, 2005
flavonoids	<i>Pisum sativum</i>	strong increase (45 %)	Nogués et al., 1998
anthocyanins	<i>Pisum sativum</i>	strong increase (over 80 %)	Nogués et al., 1998
epicatechins	<i>Camellia sinensis</i>	massive increase	Hernandez et al., 2006
dihydroxy-xanthone	<i>Hypericum brasiliense</i>	strong increase (over 300 %)	deAbreu & Mazzafera, 2005
betulinic acid	<i>Hypericum brasiliense</i>	strong increase (about 60 %)	deAbreu & Mazzafera, 2005

Table 1b:

Drought stress entails a concentration increase of various secondary plant products: nitrogen containing secondary plant products

morphine alkaloids	<i>Papaver somniferum</i>	strong increase	Szabo et al., 2003
chinolizidin alkaloids	<i>Lupinus angustifolius</i>	strong increase	Christiansen et al., 1997
pyrrolizidine alkaloids	<i>Senecio longilobus</i>	strong increase	Briske & Camp, 1982
trigonelline	<i>Glycine max</i>	strong increase	Cho et al., 2003
cyanogenic glucosides	<i>Manihot esculenta</i>	strong increase	DeBruijn, 1973
cyanogenic glucosides	<i>Manihot esculenta</i>	strong increase	Okogbenin et al., 2003
cyanogenic glucosides	<i>Triglochin maritima</i>	strong increase	Clawson & Moran, 1937
cyanogenic glucosides	<i>Eucalyptus cladocalyx</i>	strong increase	Woodrow et al., 2002
glucosinolates	<i>Brassica napus</i>	massive increase	Jensen et al., 1996
glucosinolates	<i>Brassica napus</i>	significant increase	Bouchereau et al., 1996

leaves, or seeds - had been of special interest. Consequently, the entire content of natural products on a whole plant basis was not in the centre of focus. Nevertheless, in some studies the information on the total content could be calculated. In the case of *Hypericum brasiliense* - where the content of various phenols and betulinic acid is drastically higher in plants grown under drought stress (Table 1a) - the data from de Abreu and Mazzafera (2005) showed that also the total amount of some secondary plant products per plant indeed is significantly higher in plants grown under drought stress than in those cultivated under normal conditions. Although stressed plants had been quite smaller, the product of biomass and substance concentration yields in a 10 % higher amount of phenolic compounds; however, the total content of betulinic acid was nearly the same in plants when grown under drought stress or under standard conditions. Also the studies published by Nogués et al. (1998), who found a massive increase of phenolic compounds in stressed peas (Table 1a), allow calculating the overall yield of the related substances. Despite the fact that the total biomass of pea plants grown under drought stress is just about one third of those cultivated under standard condition, the overall amount of anthocyanins (product of biomass and anthocyanin concentration) is about 25 % higher in the stressed plants. Apart from that, the overall yield of total flavanoids was nearly the same in *Pisum sativum* plants grown under drought stress or under non-stress conditions.

As outlined for plants suffering drought stress, also in those exposed to salt stress, the concentration of active compounds is higher than in the control plants cultivated under standard conditions. The corresponding data are given in Table 2. As mentioned for the drought stress experiments, also the related salt-stress grown plants reveal a significant smaller biomass than the control plants. Consequently, only from those literature data, where in addition to the concentration of natural products also solid data on the different biomass gains are mentioned, reliable statement on the causales for the higher metabolite concentrations under salt stress condition can be drawn. Thus, in most cases, it is not decidable, if the higher concentra-

tions detected for the stressed plants indeed result from a higher overall amount of metabolites or might be due to a putative increase in concentration that could be ascribed to the reduced biomass. The latter effect obviously was monitored by Brachet & Cosson (1986) who determined a strong increase in the concentration of tropane alkaloids in salt stressed plants. When calculated on the total biomass of the corresponding plants, the reputed increase is compensated fully by the decrease of entire biomass. Also for *Hordeum vulgare*, the significant higher concentration of flavanoids observed in salt stressed plants (Ali & Abbas, 2003) indeed is due to a very pronounced reduction of biomass (40 %). Therefore - despite an significant enhancement of the flavanoids concentration in stressed plants - the overall amount of flavanoids in these stressed plants is quite lower than in the control plants. Unfortunately, no further data with respect to the total biomass gains in salt stressed and unstressed plants are available, and thus no statement with respect of a real biomass enhancement can be drawn. Yet, in contrast to drought stress, the situation seems to be much more unclear.

As outlined above, plants that suffer drought stress generate a high oversupply of reduction equivalents. Despite the fact that massive amounts of NADPH + H⁺ are reoxidized by photorespiration and the xanthophyll cycle, under such stress conditions, the corresponding strong reduction power seems to enhance the synthesis of highly reduced compounds, like isoprenoids, phenols or alkaloids. Consequently, the synthesis and accumulation of highly reduced secondary plant products reveals - apart from their ecological significance - a meaning within the metabolism to prevent too massive generation of oxygen radicals and the corresponding damage by photoinhibition (Selmar, 1992). It is not comprehensible, why these evident coherences have not been considered adequately up to now, neither in the field of general plant physiology and biochemistry nor in special reflections of secondary plant products. Dixon & Paiva (1995) proposed a further potentiality for the metabolism related impact of secondary compounds. Due to their capacity to scavenge reactive oxygen species, these authors propose that the phenylpropanoid derived

Table 2:
Salt stress entails a concentration increase of various secondary plant products

flavonoids	<i>Hordeum vulgare</i>	significant increase	Ali & Abbas, 2003
anthocyanins	<i>Grevillea spec.</i>	significant increase	Kennedy et al., 1999
tropane alkaloids	<i>Datura innoxia</i>	strong increase	Brachet & Cosson;1986)
trigonelline	<i>Glycine max</i>	strong increase	Cho et al., 1999
glycinebetaine	<i>Trifolium repens</i>	massive increase	Varshney et al., 1988
di- and polyamines	<i>Oryza sativa</i>	massive increase (up to 200 %)	Krishnamurthy & Bhagwat, 1989
glycinebetaine	<i>Triticum aestivum</i>	massive increase	Krishnamurthy & Bhagwat, 1989

phenols, i.e. flavanoids, tannins, hydroxycinnamate esters, which are produced in the course of various stress situations, represent important radical scavengers. These aspects of the significance of secondary metabolites provide could contribute to the understanding of the high plasticity and variability of secondary metabolism. If we argue that in stressed plants *per se* a high pressure for the synthesis of highly reduced compounds arises, it is not deceptive that - in the course of ordinary mutations - a whole array of substances will occur which then are subject of selection pressure by environmental effects, i.e. herbivory, pathogen attacks, anorganic stresses.

In this context a general remark should be outlined: In most discussions related to secondary plant products, scientists try to ascribe certain functions for these natural products, e.g. a protective function against herbivores or pathogens, or an attracting role for pollinators and seed spreading animals. As outlined above, there is no doubt that secondary plant products have a great importance in the ecosystem and that the selection advantages by their corresponding attracting or repelling effects had been the basis for their manifestation by evolution. However, in many treatises and discussions, the corresponding functions are described in a Lamarckistic sense: "*the plants produce theses compounds in order to get protected or to attract pollinators*". Such teleological statements, however, imply that evolution is target oriented, which of course is not the case. Biology tries to handle this contradiction by pointing to the Darwinistic principles of mutation and selection: when the biosynthesis and accumulation of a certain secondary plant product took place, i.e. due to corresponding mutations, the optimization of its synthesis and the establishment in metabolism is the result of evolutive processes driven by the selection power of corresponding advantages by ecological function. During the course of evolution, this property is manifested, conserved, and integrated in the population. There is no doubt that the importance of the accumulated substance is determined by its ecological significance - however this should not be equated with the statement that these substances fulfill a purpose. In this paper, the terms "function" and "significance" are used in the strict natural scientific context and not in a teleological, Lamarckistic view.

4 Consequences of the stress enhanced accumulation of secondary plant products for the cultivation of spices and medicinal plants

The data compiled from the literature confirm that the concentration enhancement of secondary plant products due to an increasing drought stress provides a plausible explanation for the conjuncture that spices derived from plants grown under mediterranean or semi-arid climate

conditions are much more pronounced in taste and aroma than those obtained from equivalent plants, but cultivated in a moderate climate. In contrast, the data on the influence of salt stress are not conclusive; a corresponding enhancement effect for secondary metabolites could not be stated unequivocally. Therefore, in contrast to the usage of drought stress, the application of salt stress seems not to be a suitable tool to increase the concentration of secondary metabolites.

In any consideration to use the effects of drought for quality improvement of spice and medicinal plants grown in Central Europe, it must be taken into consideration that a concentration increase of active compounds induced by moderate drought stress in general is associated with a reduction of biomass production. Consequently, it has to be clarified if - and maybe to what extent - the putative gain in quality by increasing the secondary plant product concentration by applying deliberately drought stress would be compensated by decreasing yields in biomass. Thus, a corresponding decision must strongly be based on the question related to the nature of the desired product. It is obvious that in the case of spices and those medicinal plants which are used directly as pharmaceuticals, the quality and thus the concentration of active compounds is much more relevant than the total yield, whereas in all cases, where the desired compounds will be extracted, the overall yield has to be very high. Related approaches on quality improvement seem to be very promising, however, in each case, a corresponding appraisalment it must be estimated. For this, however, the comprehensive knowledge of the conjuncture and the special situation for the particular plants and their cultivation condition is required. A successful and effective application of deliberate drought stress for quality improvement, e.g. by applying special watering regimes in combination with efficient soil draining by supplementation of sand, is an encouraging new tool for the production of spice and pharmaceutical relevant plants, but it implies solid and comprehensive research on the entire field mentioned above.

References

- Ali RM, Abbas HM (2003) Response of salt stressed barley seedlings to phenylurea Plant Soil Environ 49(4):158-162
- Bouchereau A, Clossais-Besnard N, Bensaoud A, Leport L, Renard M (1995) Water stress effects on rapeseed quality. European J Agron 5:19-30
- Brachet J, Cosson L (1986) Changes in the total alkaloid content of datura innoxia Mill. subjected to salt stress. J Experimental Bot 37:650-656
- Briske DD, Camp BJ (1982) Water stress increases alkaloid concentrations in threadleaf groundsel (*Senecio longilobus*). Weed Sci 30(1):106-108
- Christiansen JL, Jørgensen B, Buskov S, Olsen CE (1997) Effect of drought stress on content and composition of seed alkaloids in narrow-leaved lupin, *Lupinus angustifolius* L. European J Agron 7:307-314
- Clawson AB, Moran EA (1937) Toxicity of arrowgrass for sheep and the reme-

- dial treatment. Technical Bulletin / USDA 580:16
- Cho Y, Lightfoot DA, Wood AJ (1999) Trigonelline concentrations in salt stressed leaves of cultivated *Glycine max*. *Phytochem* 52(7):1235-1238
- Cho Y, Njitiv N, Chen X, Lightfoot DA, Wood AJ (2003) Trigonelline concentration in field-grown soybean in response to irrigation. *Biol Plant* 46(3):405-410
- de Abreu IN, Mazzafera P (2005) Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol Biochem* 43:241-248
- De Bruijn GH (1973) The cyanogenic character of cassava (*Manihot esculenta*). In: Nestel B, MacIntyre R (eds) Chronic cassava toxicity : proceedings of an interdisciplinary workshop, London, England, 29 - 30 January 1973. Ottawa : Internat Development Research Centre, pp 43-48
- Del Moral R (1972) On the variability of chlorogenic acid concentration *Oecologia* 9:289-300
- Delitala I-F, Gessa C, Solinas V (1986) Water stress and flexibility of phenolic metabolism in *thymus capitatus*. *Fitoterapia* 57(6):401-408
- Biehler K, Fock H (1996) Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiol* 112:265-272
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111
- Chen HX, Gao HY, An SZ, Li WJ (2004) Dissipation of excess energy in Mehler-peroxidase reaction in *Rumex* leaves during salt shock *Photosynthetica*. 42(1):117-122
- Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc London Ser B* 355:1499-1510
- Gray DE, Pallardy SG, Garrett HE, Rottinghaus G (2003) Acute drought stress and plant age effects on alkamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. *Planta Med* 69(1):50-55
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol* 51:463-499
- Hernaéndez I, Alegre L, Munné-Bosch S (2006) Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochem* 67:1120-1126
- Hideg E, Spetea C, Vass I (1995) Superoxide radicals are not the main promoters of acceptor-side-induced photoinhibitory damage in spinach thylakoids. *Photosynth Res* 46:399-407
- Jakob B, Heber U (1996) Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves and relation to photoinactivation of Photosystems I and II. *Plant Cell Physiol* 37(5):629-635
- Jensen CR, Mogensen VO, Mortensen G, Fieldsend JK, Milford GFJ, Andersen MN, Thage JH (1996) Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brassica napus* L.) affected by soil drying and evaporative demand. *Field Crops Res* 47:93-105
- Kennedy BF, De Filippis LF (1999) Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J Plant Physiol* 155(6):746-754
- Krishnamurthy R, Bhagwat KA (1989) Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol* 91:500-504
- Krishnamurthy R, Bhagwat KA (1990) Accumulation of choline and glycine-betaine in salt-stressed wheat seedlings. *Curr Sci* 59(2):111-112
- Kubota N, Mimura H, Shimamura K (1988) The effects of drought and flooding on the phenolic compounds in peach fruits. *Okayama Daigaku Nogakubu Gakujutsu* 171:17-21
- Latowski D, Grzyb J, Strzałka K (2004) The xanthophyll cycle - molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiol Plant* 26(2):197-212
- Lin RC, Xu CC, Li LB, Kuang TY (2002) Xanthophyll cycle and its molecular mechanism in photoprotection. *Acta Bot Sin* 44(4):379-383
- Nogueés S, Allen DJ, Morison JIL, Baker NR (1998) Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiol* 117:173-181
- Okogbenin E, Ekanayake IJ, Porto MCM (2003) Genotypic variability in adaptation responses of selected clones of cassava to drought stress in the Sudan savanna zone of Nigeria. *J Agron Crop Sci* 189(6):376-389
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants : a review. *Ecotoxicol Environ Safety* 60:324-349
- Selmar D (1992) Die Metabolisierung cyanogener Verbindungen : pflanzenphysiologische und biochemische Untersuchungen zum Metabolismus cyanogener Naturstoffe als Basis einer Betrachtung der Multifunktionalität sekundärer Pflanzenstoffe. Braunschweig : Univ, 197 p, [Habilitation]
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress : the root antioxidative system *Physiol Plant* 112(4):487-494
- Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125(1):27-58
- Szabó B, Tyihák E, Szabó LG, Botz L (2003) Mycotoxin and drought stress induced change of alkaloid content of *Papaver somniferum* plantlets. *Acta Bot Hungarica* 45(3/4):409-417
- Varshney KA, Gangwar LP (1988) Choline and betaine accumulation in *Trifolium alexandrinum* L. during salt stress. *Egypt J Botany* 31(1-3):81-86
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration : metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc London Ser B* 355:1517-1529
- Woodrow IE, Slocum DJ, Gleadow RM (2002) Influence of water stress on cyanogenic capacity in *Eucalyptus cladocalyx*. *Funct Plant Biol* 29(1):103-110
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM (2002) Salt stress tolerance of plants. *Working Rep / Jpn Intern Res Center Agric Sci* 25-33
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 53:247-273

Lieferbare Sonderhefte / Special issues available

286	Silvia Haneklaus, Rose-Marie Rietz, Jutta Rogasik and Susanne Schroetter (eds.) (2005) Recent advances in in agricultural chemistry	11,00€
287	Maria del Carmen Rivas (2005) Interactions between soil uranium contamination and fertilization with N, P and S on the uranium content and uptake of corn, sunflower and beans, and soil microbiological parameters	8,00€
288	Alexandra Izosimova (2005) Modelling the interaction between Calcium and Nickel in the soil-plant system	8,00€
290	Gerold Rahmann (Hrsg.) (2005) Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2005	9,00€
292	Franz-Josef Bockisch und Elisabeth Leicht-Eckardt (Hrsg.) (2006) Nachhaltige Herstellung und Vermarktung landwirtschaftlicher Erzeugnisse	15,00€
293	Judith Zucker (2006) Analyse der Leistungsfähigkeit und des Nutzens von Evaluationen der Politik zur Entwicklung ländlicher Räume in Deutschland und Großbritannien am Beispiel der einzelbetrieblichen Investitionsförderung	12,00€
294	Gerhard Flachowsky (Hrsg.) (2006) Möglichkeiten der Dekontamination von "Unerwünschten Stoffen nach Anlage 5 der Futtermittelverordnung (2006)"	15,00€
295	Hiltrud Nieberg und Heike Kuhnert (2006) Förderung des ökologischen Landbaus in Deutschland — Stand, Entwicklung und internationale Perspektive	14,00€
296	Wilfried Brade und Gerhard Flachowsky (Hrsg.) (2006) Schweinezucht und Schweinefleischerzeugung - Empfehlungen für die Praxis	12,00€
297	Hazem Abdelnabby (2006) Investigations on possibilities to improve the antiphytopathogenic potential of soils against the cyst nematode <i>Heterodera schachtii</i> and the citrus nematode <i>Tylenchulus semipenetrans</i>	8,00€
298	Gerold Rahmann (Hrsg.) (2006) Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2006	9,00€
299	Franz-Josef Bockisch und Klaus-Dieter Vorlop (Hrsg.) (2006) Aktuelles zur Milcherzeugung	8,00€
300	Analyse politischer Handlungsoptionen für den Milchmarkt (2006)	12,00€
301	Hartmut Ramm (2006) Einfluß bodenchemischer Standortfaktoren auf Wachstum und pharmazeutische Qualität von Eichenmisteln (<i>Viscum album</i> auf <i>Quercus robur</i> und <i>petraea</i>)	11,00€
302	Ute Knierim, Lars Schrader und Andreas Steiger (Hrsg.) (2006) Alternative Legehennenhaltung in der Praxis: Erfahrungen, Probleme, Lösungsansätze	12,00€
303	Claus Mayer, Tanja Thio, Heike Schulze Westerath, Pete Ossent, Lorenz Gygax, Beat Wechsler und Katharina Friedli (2007) Vergleich von Betonspaltenböden, gummimodifizierten Spaltenböden und Buchten mit Einstreu in der Bullenmast unter dem Gesichtspunkt der Tiergerechtigkeit	8,00€
304	Ulrich Dämmgen (Hrsg.) (2007) Calculations of Emissions from German Agriculture — National Emission Inventory Report (NIR) 2007 for 2005	16,00€
[304]	Introduction, Methods and Data (GAS-EM)	
[304A]	Tables	
	Berechnungen der Emissionen aus der deutschen Landwirtschaft — Nationaler Emissionsbericht (NIR) 2007 für 2005	
[304]	Einführung, Methoden und Daten (GAS-EM)	
[304 A]	Tabellen	

305	Joachim Brunotte (2007) Konservierende Bodenbearbeitung als Beitrag zur Minderung von Bodenschadverdichtungen, Bodenerosion, Run off und Mykotoxinbildung im Getreide	14,00€
306	Uwe Petersen, Sabine Kruse, Sven Dänicke und Gerhard Flachowsky (Hrsg.) (2007) Meilensteine für die Futtermittelsicherheit	10,00€
307	Bernhard Osterburg und Tania Runge (Hrsg.) (2007) Maßnahmen zur Reduzierung von Stickstoffeinträgen in Gewässer – eine wasserschutzorientierte Landwirtschaft zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie	15,00€
308	Torsten Hinz and Karin Tamoschat-Depolt (eds.) (2007) Particulate Matter in and from Agriculture	12,00€
309	Hans Marten Paulsen und Martin Schochow (Hrsg.) (2007) Anbau von Mischkulturen mit Ölpflanzen zur Verbesserung der Flächenproduktivität im ökologischen Landbau – Nährstoffaufnahme, Unkrautunterdrückung, Schaderregerbefall und Produktqualitäten	9,00€
310	Hans-Joachim Weigel und Stefan Schrader (Hrsg.) (2007) Forschungsarbeiten zum Thema Biodiversität aus den Forschungseinrichtungen des BMELV	13,00€
311	Mamdoh Sattouf (2007) Identifying the Origin of Rock Phosphates and Phosphorus Fertilisers Using Isotope Ratio Techniques and Heavy Metal Patterns	12,00€
312	Fahmia Aljmli (2007) Classification of oilseed rape visiting insects in relation to the sulphur supply	15,00€
313	Wilfried Brade und Gerhard Flachowsky (Hrsg.) (2007) Rinderzucht und Rindfleischerzeugung - Empfehlungen für die Praxis	10,00€
314	Gerold Rahmann (Hrsg.) (2007) Ressortforschung für den Ökologischen Landbau, Schwerpunkt: Pflanze	12,00€
315	Andreas Tietz (Hrsg.) (2007) Ländliche Entwicklungsprogramme 2007 bis 2013 in Deutschland im Vergleich — Finanzen, Schwerpunkte, Maßnahmen	12,00€
316	Michaela Schaller und Hans-Joachim Weigel (2007) Analyse des Sachstands zu Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die deutsche Landwirtschaft und Maßnahmen zur Anpassung	16,00€
317	Jan-Gerd Krentler (2008) Vermeidung von Boden- und Grundwasserbelastungen beim Bau von Güllelagern Prevention of soil and groundwater contamination from animal waste storage facilities	12,00€
318	Yelto Zimmer, Stefan Berenz, Helmut Döhler, Folkhard Isermeyer, Ludwig Leible, Norbert Schmitz, Jörg Schweinle, Thore Toews, Ulrich Tuch, Armin Vetter, Thomas de Witte (2008) Klima- und energiepolitische Analyse ausgewählter Bioenergie-Linien	14,00€

Dr. Jürgen Bender, Institut für Agrarrelevante Klimaforschung, vTI
Dr. Jutta Berk, Institut für Tierschutz und Tierhaltung, FLI
Prof. Dr. Franz-Josef Bockisch, Institut für Anwendungstechnik, JKI
Dr. Herwart Böhm, Institut für Ökologischen Landbau, vTI
Prof. Dr. Andreas Bolte, Institut für Waldökologie und Waldinventuren, vTI
PD Dr. Martina Brockmeier, Institut für Marktanalyse und Agrarhandelspolitik, vTI
Dr. Ulrich Dämmgen, Institut für Agrarrelevante Klimaforschung, vTI
PD Dr. Sven Dänicke, Institut für Tierernährung, FLI
Dr. habil. Bernd Degen, Institut für Forstgenetik, vTI
Dr. Matthias Dieter, Institut für Ökonomie der Forst- und Holzwirtschaft, vTI
PD Dr. habil. Bettina Eichler-Löbermann, Universität Rostock
Dr. Peter Elsasser, Institut für Ökonomie der Forst- und Holzwirtschaft, vTI
Prof. Dr. Andreas Fangmeier, Universität Hohenheim
PD Dr. Matthias Fladung, Institut für Forstgenetik, vTI
Prof. Dr. Ulrike Grabski-Kieron, Universität Münster
PD Dr. Jörg-Michael Greef, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, JKI
Prof. Dr. Konrad Hagedorn, Humboldt-Universität Berlin
PD Dr. Ingrid Halle, Institut für Tierernährung, FLI
Dr. Silvia Haneklaus, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, JKI
Prof. Dr. Eberhard Hartung, Universität Kiel
Prof. Dr. Roland Herrmann, Universität Gießen
Prof. Dr. habil. Pierre Ibisch, FH Eberswalde
Prof. Dr. Folkhard Isermeyer, Institut für Betriebswirtschaft, vTI
Dipl. Ing.-Agr. Robert Kaufmann, Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Schweiz
Dr. Jörg Kleinschmit, Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
Prof. Dr. Luit de Kok, Universität Groningen, Niederlande
Prof. Dr. Uwe Latacz-Lohmann, Universität Kiel
Dr. Oliver von Ledebur, Institut für Marktanalyse und Agrarhandelspolitik, vTI
Prof. Dr. Bernd Linke, Institut für Agrartechnik Bornim e.V.
Dipl. Met. Franz-Josef Löpmeier, Agrarmeteorologische Forschung des Deutschen Wetterdienstes
Prof. Dr. Udo Mantau, Universität Hamburg
Prof. Dr. Axel Munack, Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik, vTI
Dr. Hiltrud Nieberg, Institut für Betriebswirtschaft, vTI
Dr. Rainer Oppermann, Institut für Ökologischen Landbau, vTI
Dr. Jürgen Puls, Institut für Holztechnologie und Holzbiologie, vTI
Prof. Dr. Gerold Rahmann, Institut für Ökologischen Landbau, vTI
Prof. Dr. Detlef Rath, Institut für Nutztiergenetik, FLI
Dr. Thomas Schneider, Institut für Weltforstwirtschaft, vTI
Prof. Dr. Dr. Ewald Schnug, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, JKI
Dr. Lars Schrader, Institut für Tierschutz und Tierhaltung, FLI
Prof. Dr. Andreas Susenbeth, Universität Kiel
Prof. Dr. Friedhelm Taube, Universität Kiel
Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop, Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik, vTI
Prof. Dr. Dr. habil. Drs. h.c. Gerd Wegener, TU München
Prof. Dr. Hans-Joachim Weigel, Institut für Biodiversität, vTI
Prof. Dr. Peter Weingarten, Institut für Ländliche Räume, vTI
Dr. Nicole Wellbrock, Institut für Waldökologie und Waldinventuren, vTI



Johann Heinrich
von Thünen-Institut

Landbauforschung
*vTI Agriculture and
Forestry Research*

Vol. 58 No. 1/2 06.2008

Preis / Price 8 €

ISSN 0458-6859