

## **Einfluss des Genotyps und der Nutzung auf die spezifische PPO-Aktivität verschiedener Rotklee-Genotypen**

N. Weiher, M. Krawutschke, M. Gierus, F. Taube

Grünland und Futterbau/Ökologischer Landbau, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel, nweiher@email.uni-kiel.de

### **Einleitung und Problemstellung**

Eine Maßnahme zur Verringerung der Stickstoffverluste in spezialisierten Milchvieh-/Futterbaubetrieben kann die Verbesserung der N-Nutzungseffizienz (NUE) der Wiederkäuer bieten. Bestimmte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie kondensierte Tannine oder die Polyphenoloxidase (PPO) können hemmend auf den raschen Proteinabbau in Silagen und den Vormägen der Wiederkäuer wirken (SULLIVAN & HATFIELD, 2006) und damit die NUE verbessern. Die im Rotklee vorkommende PPO ist verantwortlich für die enzymatische Bräunungsreaktion, bei der eine Hydroxylation von Monophenolen zu o-Diphenolen sowie eine Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen erfolgen. Diese o-Chinone sind sehr reaktiv, können an Proteine oder Phenole binden und Chinon-Protein-Komplexe bilden. Unterschiede in der PPO-Aktivität wurden zwischen verschiedenen Rotkleearten und im Jahresverlauf (FOTHREGILL & REES, 2006, WINTERS *et al.*, 2008, EICKLER, 2008) festgestellt, aber auch bedingt durch das Nutzungssystem (EICKLER, 2008). Um Rotklee-Genotypen mit einer verbesserten Futterqualität zu identifizieren, wird in einem zweijährigen Feldversuch deshalb der Frage nachgegangen, welchen Einfluss verschiedene Genotypen und Nutzungssysteme auf die spezifische PPO-Aktivität und damit auf die Futterqualität ausüben. Erste Ergebnisse werden im vorliegenden Beitrag vorgestellt.

### **Material und Methoden**

Datengrundlage bildet ein am Standort Hohenlieth (Ls, Ø 8,9 °C, Ø 804,5 mm) angelegter Feldversuch mit den Prüffaktoren Nutzungssystem und Genotypen in dreifacher Wiederholung. Dabei werden 12 Rotklee (*Trifolium pratense* L.)-Genotypen und Weißklee (*T. repens*) (Sorte Vysocan) als Kontrolle in den beiden Systemen ohne und mit mechanischem Stress (simulierte Beweidung; Cambridge-Walze drei Wochen vor Schnitttermin) verglichen. Es erfolgte eine 4-Schnitt-Nutzung im Abstand von sechs Wochen (20.05., 30.06., 11.08. und 22.09.08). Zu jedem Schnitttermin wurde an je 50 Trieben pro Parzelle das phänologische Entwicklungsstadium (mean stage by count - MSC) nach FAGERBERG (1988) bestimmt. Um die Erträge und das Blatt/Gewichtsverhältnis (BGV) zu erfassen wurde mit einer Rasenkantenschere jeweils Pflanzenmaterial von zwei bis drei Quadraten mit einer Fläche von 0,25 m<sup>2</sup> in einer Schnitthöhe von 5 cm entnommen. Die Proben für die Bestimmung der spezifischen PPO-Aktivität wurden in Blatt und Stängel getrennt und die Blätter in Päckchen zu 8 g bei -27 °C tiefgefroren. Die Extraktion der PPO erfolgte in

Anlehnung an *ESCRIBANO et al. (1997)* unter Flüssig-Stickstoff mit Phosphatpuffer und Proteinaseinhibitoren. Nach der Zugabe von Kaffeesäure als Substrat fand eine minütliche Bestimmung von 0-12 min photometrisch bei 400 nm statt. Das Gesamtprotein wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Angegeben wird die spezifische PPO-Aktivität in IU bezogen auf Protein ( $\mu\text{g g}^{-1}$  TS) als diejenige Enzymmenge, die eine Absorptionsänderung von  $0,001 \text{ min}^{-1}$  verursacht. Die spezifische PPO-Aktivität wurde um das BGV korrigiert. Die gewonnenen Daten wurden einer Varianzanalyse (mixed procedure ANOVA SAS 9.1) unterzogen. Multiple Mittelwertvergleiche erfolgten mittels Tukey-Test ( $P < 0,05$ ). Bei der Auswertung der spezifischen PPO-Aktivität wurden die Aufwüchse als Messwiederholung berücksichtigt.

### Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die Jahreserträge 2008 der verschiedenen Genotypen des 4-Schnittsystems am Standort Hohenlieth.

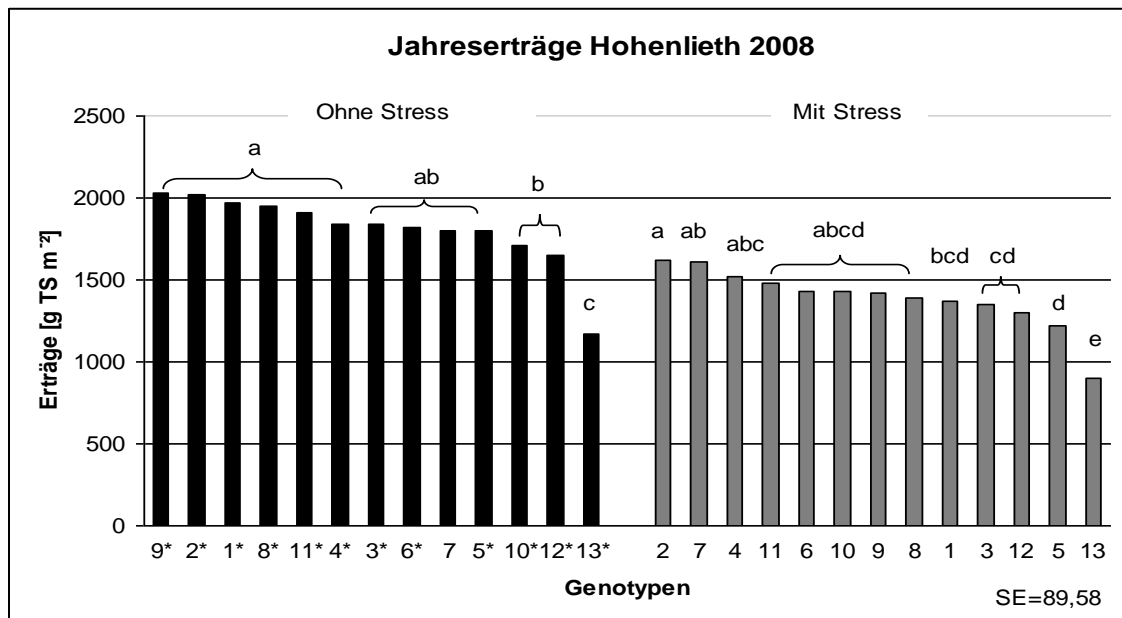


Abb. 1: Jahreserträge der 4-Schnittnutzung am Standort Hohenlieth 2008 a, b zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen im jeweiligen Nutzungssystem ( $p < 0,05$ ), \* symbolisiert signifikante Unterschiede innerhalb eines Genotyps zwischen den beiden Nutzungssystemen ( $p < 0,05$ ).

Die Jahreserträge lagen für Rotklee ohne Stress zwischen 1646 und 2034 g TS m<sup>-2</sup>, in der Variante mit mechanischem Stress erreichten die Rotklee-Genotypen zwischen 1300 und 1416 g TS m<sup>-2</sup>. Das erzielte Ertragsniveau ist typisch für Schleswig-Holstein, wie andere Untersuchungen zeigten (*LOGES & TAUBE, 1999*). Deutlich zu sehen ist, dass die Erträge in der ungestressten Variante bei allen Genotypen höher sind als jene in der gestressten Variante. Mit mechanischem Stress erreichen die verschiedenen Genotypen nur rund 80 % des Ertrages der Variante ohne Stress mit Ausnahme von Genotyp 7, hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Nutzungssystemen. Weißklee wies in beiden Nutzungssystemen die geringsten Erträge auf.

Die spezifische PPO-Aktivität der verschiedenen Genotypen wurde bei allen vier Aufwüchsen gemessen, wobei im System mit Stress meist höhere Messwerte als im System ohne Stress ermittelt wurden. Dabei zeigte Weißklee (Genotyp 13) stets die geringste PPO-Aktivität. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen im System ohne Stress konnten für den 4. Aufwuchs abgesichert werden. Im Nutzungssystem mit mechanischem Stress zeigte sich eine deutlichere Differenzierung der spezifischen PPO-Aktivität zwischen den einzelnen Rotklee genotypen (Tab. 1). Bei beiden Systemen wurden die höchsten Werte beim letzten Schnittermin am Ende der Vegetationsperiode beobachtet, was auch frühere Untersuchungen zeigten (Eickler, 2007). Zu diesem Termin hat das Nutzungssystem einen besonders starken Effekt, signifikante Unterschiede konnten für die Genotypen 1, 5, 6, 7, 8 und 11 festgestellt werden.

Tab. 1: Spezifische PPO-Aktivität in IU ( $\mu\text{g Protein g}^{-1}\text{ TS}$ ) um BGV korrigiert

Genotyp	1.Termin 08		2.Termin 08		3.Termin 08		4.Termin 08	
	Ohne Stress	Mit Stress	Ohne Stress	Mit Stress	Ohne Stress	Mit Stress	Ohne Stress	Mit Stress
1	0,41	0,57 <sup>ab</sup>	0,35	0,59	0,58	1,85 <sup>a</sup>	1,39 <sup>ab</sup>	3,32 <sup>abA</sup>
2	0,24	0,85 <sup>ab</sup>	0,46	0,66	0,38	0,98 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>abA</sup>	1,49 <sup>defA</sup>
3	0,74	1,60 <sup>a</sup>	0,49	0,72	0,49	1,67 <sup>a</sup>	1,18 <sup>abA</sup>	1,78 <sup>cdefA</sup>
4	0,59	0,56 <sup>ab</sup>	0,25	0,35	0,51	1,05 <sup>ab</sup>	1,45 <sup>aA</sup>	1,03 <sup>fgA</sup>
5	0,66	0,99 <sup>ab</sup>	0,78	0,63	0,47	1,42 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>abB</sup>	3,92 <sup>aA</sup>
6	0,42	0,67 <sup>ab</sup>	0,24	0,85	0,57	1,19 <sup>ab</sup>	1,23 <sup>abB</sup>	2,61 <sup>abcdA</sup>
7	0,16	0,76 <sup>ab</sup>	0,32	0,32	0,77	2,07 <sup>a</sup>	0,73 <sup>abB</sup>	3,27 <sup>abA</sup>
8	0,35	0,84 <sup>ab</sup>	0,51	0,97	0,72	1,45 <sup>a</sup>	1,58 <sup>ab</sup>	3,07 <sup>abcA</sup>
9	0,53	0,64 <sup>ab</sup>	0,42	0,50	0,57	1,34 <sup>ab</sup>	1,93 <sup>aA</sup>	2,42 <sup>bcdeA</sup>
10	0,51	0,64 <sup>ab</sup>	0,44	0,59	0,70	1,66 <sup>a</sup>	1,90 <sup>aA</sup>	2,16 <sup>bcdefA</sup>
11	0,38	0,64 <sup>ab</sup>	0,39	0,78	0,58	1,29 <sup>ab</sup>	0,69 <sup>abB</sup>	2,21 <sup>bcdefA</sup>
12	0,23	0,38 <sup>ab</sup>	0,55	0,84	0,60	0,98 <sup>ab</sup>	0,81 <sup>abA</sup>	1,21 <sup>efgA</sup>
13	0,04	0,02 <sup>b</sup>	0,06	0,06	0,06	0,10 <sup>b</sup>	0,02 <sup>bA</sup>	0,08 <sup>gA</sup>

<sup>a, b</sup> zeigen signifikante Unterschiede zwischen Genotypen innerhalb eines Nutzungssystems und eines Aufwuchses; <sup>A, B</sup> zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Nutzungssystemen innerhalb des Genotyps und eines Aufwuchses (p < 0,05, SE= 0,21)

Neben Genotyp und Nutzungssystem spielt der Aufwuchs ebenso eine wichtige Rolle. Zum letzten Termin wiesen alle Genotypen einen geringeren MSC (die Rotkleepflanzen waren demnach weniger weit entwickelt als zu den Schnittzeitpunkten davor) als bei den ersten drei Aufwüchsen auf, was für die beobachteten Werte auf den Einfluss von Witterung und Alter (phänologische Entwicklung) der Rotkleepflanzen zum Schnittzeitpunkt hinweist.

### Schlussfolgerungen

Innerhalb des Ertragsniveaus war eine deutliche Rangierung der Rotklee-Genotypen zu verzeichnen, mechanischer Stress führte zu einer Verringerung der Jahreserträge. Unterschiedliche Nutzungssysteme haben einen Einfluss auf die spezifische PPO-Aktivität, als Reaktion auf (mechanischen) Stress war die spezifische PPO-Aktivität erhöht. Neben Genotyp und Nutzungssystem spielte auch der Aufwuchs eine maßgebliche Rolle. Zum letzten Schnittermin war die spezifische PPO-Aktivität am höchsten, hier gab es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Rotklee-Genotypen, die statistisch abgesichert werden konnten. Rückschlüsse auf Futterqualität lassen sich anhand der einjährigen Daten der spezifischen PPO-Aktivitäten noch nicht treffen.

### Literatur

- EICKLER, B. (2008): Nutritive value of forage legumes with special reference to polyphenol oxidase activity in red clover. *Dissertation*. Universität Kiel.
- EICKLER, B., GIERUS, M., TAUBE, F. (2007): Einfluss der Grünlandnutzung auf die PPO-Aktivität in Rotklee. In: Zikeli, S., Claupein, W., Dabbert, S., Kaufmann, B., Müller, T. und Valle Zárate, A. (Hrsg.): Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Hohenheim, 541-544.
- ESCRIBANO, J., CABANES, J., CHAZARRA, S. GARCIA-CARMONA, F. (1997): Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4209-4214.
- FAGERBERG, B. (1988): Phenological development in timothy, red clover and Lucerne. *Acta Agric. Scand.* 38, 159-170.
- FOTHERGILL, M., REES, M.E. (2006): Seasonal differences in polyphenol oxidase activity in red clover. In: Wachendorf, M., Helgadottir, A., Parente, G. (eds) Sward dynamics, N-flows and forage utilisation in legume-based systems. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> COST 852 Workshop, Grado, Italy, 2005, pp.141-144.
- LOGES, R. und TAUBE, F. (1999): Ertrag und Futterqualität von Rotklee und Luzerne als Reinsaat sowie in Gemenge mit Gräsern. In: Hoffmann, H., Müller, S. (Hrsg.): Beiträge zur 5. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Berlin, 501-504.
- SULLIVAN, M.L., HATFIELD, R.D. (2006): Polyphenol oxidase and o-diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science*, 46, 662-670.
- WINTERS, A.L., MINCHIN, F.R., MICHAELSON-YEATES, T.P.T., LEE, M.R.F., MORRIS, P. (2008): Latent and active polyphenol oxidase (PPO) in red clover (*Trifolium pratense*) and use of a low PPO mutant to study the role of PPO in proteolysis reduction. *J. Agric. Food Chem. Science*, 56, 2817-2824.