

## **PPO-Aktivität in Rotklee unter Berücksichtigung von Genotyp, Umweltfaktoren und Nutzungsintensität - Einfluss auf die Proteinqualität**

B. Eickler, M. Gierus, F. Taube

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, -Grünland und Futterbau/Ökologischer  
Landbau-, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, D-24098 Kiel;  
Email: beickler@email.uni-kiel.de

### **Einleitung und Problemstellung**

Die hohen Gehalte an schnell abbaubarem Protein in Futterleguminosen können bei einem ungünstigen Protein-Energie-Quotienten des Futters von den Pansenmikroorganismen der Wiederkäuer nur unzureichend verwertet werden. Durch eine erhöhte Proteinabbaurate sind somit eine resultierende geringere N-Nutzungseffizienz und erhöhte N-Verluste möglich, die als Nitratfrachten im Sickerwasser besonders unter Beweidung zur Umweltbelastung beitragen können. Diesbezüglich besteht ein vermehrtes Interesse an der Wirkung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in Futterleguminosen wie kondensierten Tanninen in Hornklee oder dem Enzym Polyphenoloxidase (PPO) in Rotklee. Die Reaktion der PPO kann zur Bildung von Chinon-Protein-Komplexen führen. Diese sind vor enzymatischem Abbau durch pflanzliche Proteine und Mikroorganismen im Pansen geschützt, es kann aber auch eine direkte Hemmung der pflanzlichen Proteasen durch die Chinone stattfinden. Ergebnisse wie ein veringertes Proteinabbau in Silage, verringerte Milch- und Blutharnstoffgehalte sowie geringere ruminale Ammoniak-N-Gehalte bei Wiederkäuern, die jeweils für Rotklee im Vergleich zu Weißklee oder Luzerne festgestellt wurden, sind in zahlreichen Studien dokumentiert und wurden in einigen Arbeiten auf einen vermuteten Einfluss der PPO-Aktivität zurückgeführt. Ein quantitativer Zusammenhang zwischen der PPO-Aktivität und Futterqualitätsparametern wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Unsere Arbeit beinhaltet die Charakterisierung der PPO-Aktivität in der Pflanze unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren wie Genotyp, Umwelt, Vegetationsverlauf und Nutzungsintensität. Weiterhin wird überprüft, ob die PPO-Aktivität als beeinflussender Parameter auf die Proteinqualität von Rotklee herangezogen werden kann.

### **Material und Methoden**

Als Datengrundlage dienen Ergebnisse aus einem Sortenversuch, der 2006 an zwei Standorten in Norddeutschland mit sechs bzw. neun Genotypen in Reinsaat als 3-Schnittsystem etabliert wurde, sowie aus einem vergleichenden Versuch unterschiedlicher Nutzungsintensitäten von Rotklee-Gras-Parzellen, welche 2005 und 2006 als 3-Schnitt- (Silo) bzw. 5-Schnittsystem (SBW) und 2005

unter Umtriebsweide (BEW) beprobt wurden. 2006 wurde zusätzlich in beiden Schnittsystemen die Applikation von mechanischem Stress (+MS) als Behandlung integriert, indem die Parzellen nach dem Schnitt mittels Cambridge-Walze gewalzt wurden, bis eine moderate Schädigung der Pflanzen sichtbar war. Unmittelbar vor dem jeweiligen Schnittermin bzw. Auftrieb der Tiere wurden auf den entsprechenden Parzellen Rotkleepflanzen in einer Schnitthöhe von 5 cm beprobt, in Blatt und Stängel getrennt und sofort eingefroren, um den aktuellen biochemischen Status zu konservieren. Die Extraktion der PPO erfolgte in Anlehnung an *ESCRIBANO et al.* (1997) aus gefrorenem Blattmaterial mittels Phosphatpuffer. Die Aktivität wurde anschließend unter Verwendung von Kaffeesäure als Substrat photometrisch gemessen und rechnerisch auf den Blattprotein-gehalt bezogen. Weitere Rotkleepflanzen wurden bei 58°C getrocknet und auf 1 mm vermahlen und standen so für die Proteinfractionierung nach *LICITRA et al.* (1996) zur Verfügung. Die Datenerhebung beinhaltete ebenfalls die Bonitur des phänologischen Entwicklungsstadiums nach *FAGERBERG* (1988) als mean stage by count (MSC) sowie die Bestimmung des Blatt-Gewichts-Verhältnisses (BGV).

In der statistischen Auswertung wurden einzelne Beobachtungen der jeweiligen Systeme einer Varianzanalyse unterzogen. Schnittermine wurden als wiederholte Messung betrachtet. Unterschiede zwischen Systemen innerhalb eines Schnittermins wurden anhand eines Student-t-Tests verglichen und mittels Bonferroni-Holm-Test korrigiert. Die Beziehung zwischen PPO-Aktivität und Futterqualitätsparametern wurde regressionsanalytisch überprüft.

## Ergebnisse und Diskussion

### Vergleich der PPO-Aktivität von Rotklee-Genotypen

**Tab. 1:** PPO-Aktivität in Rotklee (IU je Protein (mg/g TS) von sechs Genotypen an zwei Standorten und drei Aufwüchsen.

	Genotyp							Aufwuchs			
	I	II	III	IV	V	VI	SE	1	2	3	SE
Ort 1	1,19	0,91	1,14	1,37	0,54	0,85	0,09	0,69	0,72	1,60	0,08
	ab	bc	ab	a,A	c,B	bc,B		y,Y	y,X	x,X	
Ort 2	1,17	1,01	0,98	1,11	1,08	1,12	0,09	1,76	0,58	0,89	0,08
				B	A	A		x,X	z,Y	y,Y	

a,b,c signifikante Unterschiede zwischen Genotypen als Mittel über die Aufwüchse eines Standorts

A,B signifikante Unterschiede zwischen den Standorten innerhalb Genotyp

x,y,z signifikante Unterschiede zwischen den Aufwüchsen eines Standorts

X,Y signifikante Unterschiede zwischen den Standorten innerhalb Aufwuchs

Die statistische Auswertung zur PPO-Aktivität im Genotypen-Vergleich zeigte signifikante ( $P < 0,001$ ) Wechselwirkungen der Faktoren Standort x Aufwuchs sowie Standort x Genotyp (Tab. 1). Die PPO-Aktivität der Aufwüchse im Mittel über die Genotypen variierte um den Faktor 3 und zeigte höchste Werte im dritten Aufwuchs an Standort 1 bzw. im ersten Aufwuchs an Standort 2. Signifikan-

te Unterschiede zwischen den Genotypen konnten nur an Standort 1 zwischen den Genotypen IV und V abgesichert werden, die sich im Mittel über die Aufwüchse um den Faktor 2,5 unterschieden.

### Vergleich der PPO-Aktivität unter verschiedenen Nutzungssystemen

Die statistische Auswertung der beiden Schnittsysteme mit unterschiedlicher Schnitthäufigkeit (SBW und Silo) ergab in beiden Fällen eine signifikante Wechselwirkung der Faktoren Jahr x Aufwuchs ( $P < 0.01$ ). Das Mittel über die Aufwüchse war bei Silo 2005 die PPO-Aktivität 3,4-fach höher als 2006. Die Variation innerhalb eines Jahres war besonders unter SBW in 2006 ausgeprägt, hier variierte die PPO-Aktivität um den Faktor 7,8.

Im Vergleich zum Schnittsystem SBW zeigte sich 2005 unter BEW eine signifikante Erhöhung der PPO-Aktivität ab dem zweiten Termin (Abb. 1). Der Anstieg unter BEW war beim vierten Termin am größten (Faktor 2,5), während die Aktivität der SBW zum gleichen Termin den niedrigsten Wert aufwies. In 2006 wurde im Vergleich zu SBW und Silo unter mechanischem Stress (+MS) ebenfalls eine Steigerung der PPO-Aktivität beobachtet, die jedoch nicht über alle Termine konstant war und nur für das System Silo statistisch abgesichert werden konnte.

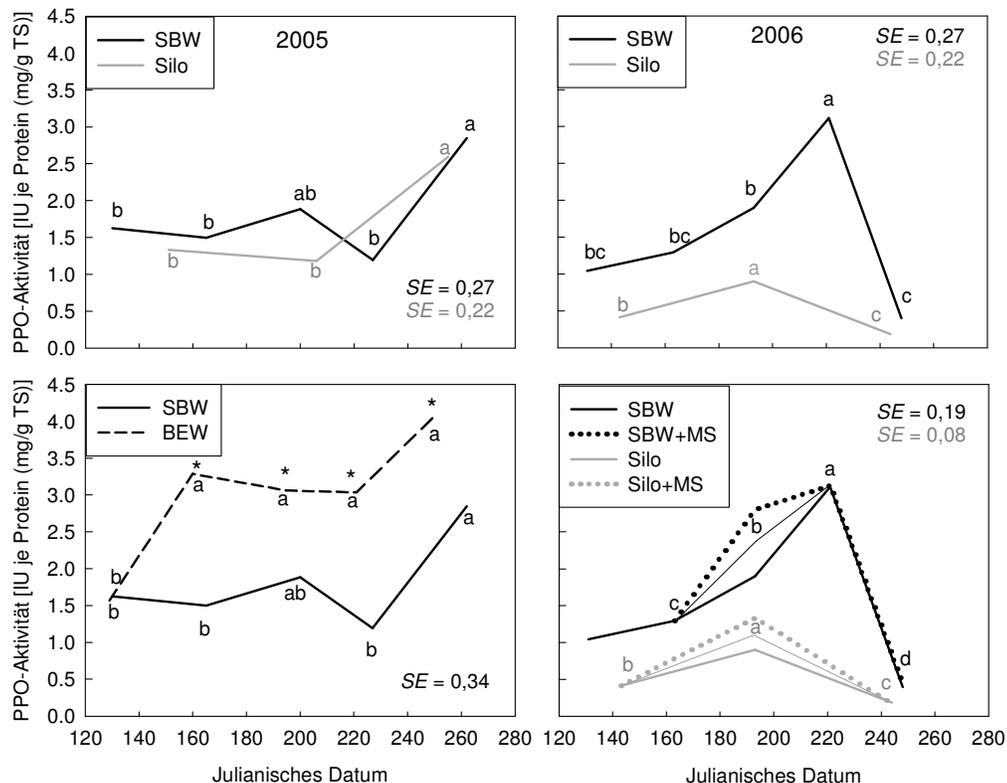


Abb. 1: PPO-Aktivität in Rotklee unter verschiedenen Nutzungssystemen.

### Zusammenhang zwischen der PPO-Aktivität und Futterqualitätsparametern

Die Regression der PPO-Aktivität mit den Proteinfractionen zeigte eine signifikante Abnahme der Fraktion A bei steigender PPO-Aktivität ( $P < 0,05$ ) sowohl

beim Genotypenversuch (Mittel über die Genotypen je Standort) als auch bei den Schnittsystemen im Jahr 2006 (Tab. 2). In beiden Datensätzen wurde die PPO-Aktivität auf das BGV bezogen. 2005 lagen diese Daten nicht vor; hier war der beobachtete Zusammenhang ( $R^2=-0,29$ ) für  $P<0.06$  signifikant.

**Tab. 2:** Einfluss der PPO-Aktivität auf die Proteinfractionen in Rotklee.

Fraktion	Genotypen <sup>1</sup> 2006 (n=36)		Silo, SBW, BEW 2005 (n=13)		Silo, SBW <sup>1</sup> 2006 (n=8)	
	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE
A	-0,15 *	61,7	-0,29 <sup>ns</sup>	17,6	-0,67 *	22,7
B1	0,36 *	14,2	-0,13 <sup>ns</sup>	18,3	<0,01 <sup>ns</sup>	19,0
B2	0,22 *	48,5	0,03 <sup>ns</sup>	86,1	<0,01 <sup>ns</sup>	58,7
B3	-0,09 <sup>ns</sup>	36,5	<0,01 <sup>ns</sup>	67,2	0,13 <sup>ns</sup>	56,7
C	<0,01 <sup>ns</sup>	16,2	-0,03 <sup>ns</sup>	23,3	0,07 <sup>ns</sup>	32,0

<sup>1</sup> Die PPO-Aktivität wurde vor der Regression auf das Blatt-Gewichts-Verhältnis (BGV) bezogen (nicht möglich für die Datenbasis von 2005); signifikante Regressionen ( $P<0.05$ ) sind mit \* gekennzeichnet; ns: nicht signifikant.

Insgesamt zeigte sich in den Ergebnissen, dass der Einfluss des Genotyps hinsichtlich der PPO-Aktivität von untergeordneter Bedeutung ist, wogegen eine Variation von Umweltfaktoren im Jahresverlauf sowie unterschiedliche Nutzungssysteme deutliche Veränderungen hervorgerufen haben. Die unter BEW und +MS erhöhten PPO-Aktivitäten können als Stressreaktion der Pflanzen gewertet werden. Die beobachtete Verringerung der Fraktion A bei ansteigender PPO-Aktivität verstärkt die Vermutung der Rolle des Enzyms als beeinflussender Parameter auf die Proteinqualität.

### Schlussfolgerungen

Es wurde gezeigt, dass eine Vielzahl möglicher Einflussfaktoren auf die PPO-Aktivität existiert. Rotklee unter entsprechend angepassten Bewirtschaftungssystemen könnte in Konsequenz zu einer Steigerung der Stickstoffnutzungseffizienz in der Wiederkäuerernährung beitragen.

### Literatur

- ESCRIBANO, J., CABANES, J., CHAZARRA, S. & GARCÍA-CARMONA, F. (1997): Characterization of monophenolase activity of table beet polyphenol oxidase. Determination of kinetic parameters on the tyramine/dopamine pair. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45, 4209-4214.
- FAGERBERG, B. (1988): Phenological development in timothy, red clover and lucerne. *Acta Agricultura Scandinavica* 38, 159-170.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, R. M. & VAN SOEST, P. J. (1996): Standardization of procedures for nitrogen fractionation in ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 57, 347-358.