

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung  
IPZ 4b: Züchtungsforschung bei Futterpflanzen,  
Pflanzenbausysteme bei Grünland und Feldfutterbau



## **Schlussbericht**

### **Forschungsthema:**

**„Sicherung und Verbesserung der Verfügbarkeit von ökologisch erzeugtem Rotkleesaatgut durch die Entwicklung von Selektionsverfahren gegenüber samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten zur Züchtung nachhaltig resistenter Sorten“**

Gefördert im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft

**Förderkennzeichen:** 2806OE161

**Projektlaufzeit:** 15.04.2009 - 31.07.2012

**Projektleiter:** Dr. Stephan Hartmann

**Projektbearbeiter:** Irene Jacob

### **Kooperationspartner:**

Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Zürich, Futterpflanzenzüchtung, Dr. Franz Xaver Schubiger

Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Zürich, Molekulare Ökologie, Dr. Roland Kölliker

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Fakultät Gartenbau und Lebensmitteltechnologie, Forschungsanstalt für Gartenbau, Institut für Pflanzenschutz, Prof. Dr. W. Gerlach

Universität Rostock, Agrar- und umweltwissenschaftliche Fakultät, Institut für Landnutzung, Phytomedizin, PD Dr. Christine Struck

### **Unterauftragnehmer:**

Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG

## **Forschungsthema:**

**„Sicherung und Verbesserung der Verfügbarkeit von ökologisch erzeugtem Rotklee Saatgut durch die Entwicklung von Selektionsverfahren gegenüber samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten zur Züchtung nachhaltig resistenter Sorten“**

## **Kurzfassung:**

Rotklee (*Trifolium pratense* L.) ist ein essentielles Fruchtfolgeglied vor allem im ökologischen Landbau, in dem er als Stickstoffsammler und Proteinlieferant für die Wiederkäuerernährung von besonderer Bedeutung ist. Derzeit scheinen neben abiotischen Ursachen vor allem die Erreger der Anthracnose (auch Südlicher Stängelbrenner genannt, *Colletotrichum trifolii*) und des Kleekrebes (*Sclerotinia trifoliorum*) für den Ausfall von Rotkleepflanzen in Deutschland verantwortlich zu sein. Für diese beiden pilzlichen Krankheiten wurden künstliche Inokulationsmethoden geprüft, da eine Selektion auf diese Resistenzen im Freiland durch ein ungleichmäßiges Auftreten der Erreger erschwert wird. Die dargestellte Methode des Anthracnoseresistenztests führt zu reproduzierbaren Ergebnissen, wohingegen die Methode des Kleekrebsresistenztests weiterer Optimierung bedarf.

Zur Untersuchung der Vererbung des Merkmals „Anthracnoseresistenz“ wurden spaltende Populationen erzeugt, die für molekulare Markeranalysen (Mikrosatelliten, SRAPs) verwendet wurden. Es konnte ein in diesem Merkmal polymorpher Marker identifiziert werden.

## **Research topic:**

**“Protection and improvement of the availability of organically produced red clover seeds by developing selection procedures for seed and soilborne fungal pathogens to breed resistant cultivars”**

## **Abstract:**

Particularly in organic farming, red clover (*Trifolium pratense* L.) is an essential crop since its ability to fix nitrogen and as a source of protein for feeding ruminants. Apart from abiotic factors, the causative organisms of southern anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) and clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) seem to be responsible for the loss of red clover plants currently occurring in Germany. We tested artificial inoculation methods for those two fungal pathogens, as selection for resistance in the field is limited, since the occurrence of the pathogens is not always guaranteed. The test for resistance concerning southern anthracnose leads to reproducible results, but the test concerning clover rot needs further optimization.

To analyze the genetics of the inheritance of resistance against *C. trifolii*, segregating populations were produced, which were later used for molecular marker analysis (microsatellites, SRAPs). One polymorphic marker was identified.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>6</b>
1.1 Gegenstand, Ziele und Aufgabenstellung des Projektes, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN	6
1.2 Planung und Ablauf des Projektes	6
<b>2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde</b>	<b>7</b>
<b>3 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse</b>	<b>8</b>
3.1 Erregersammlung	8
3.2 Künstliche Infektionen	12
3.2.1 <i>Colletotrichum</i> -Resistenztest	12
3.2.2 <i>Sclerotinia</i> -Resistenztest	15
3.2.3 <i>Phoma</i> -Resistenztest	22
3.3 Freilandversuche	25
3.4 Aufbau spaltender Populationen	33
3.5 Molekulare Marker	37
3.6 Kleekrebs-AFLP-Analysen	40
<b>4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der erzielten Ergebnisse, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>6 Übersicht realisierter Veröffentlichungen</b>	<b>46</b>
<b>Anhang</b>	<b>48</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP	Arbeitspaket
BHT	Breite-Höhe-Tiefe
bp	Basenpaare
BSA	Bulked Segregant Analysis
cm	Zentimeter
CH	Schweiz
D	Deutschland
d	Tage
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	days post inoculation (Tage nach der Inokulation)
dt	Dezitonne
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F1	erste Filialgeneration
F2	zweite Filialgeneration
g	Gramm
H	Hafer
h	Stunde
ha	Hektar
HNJ	Hauptnutzungsjahr
Hz	Herz
km	Kilometer
LUZ	Luzerne
M	Meilenstein
m	Meter
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
mm	Millimeter
NN	Normalnull

PDA	Potato dextrose agar
PVC	Polyvinylchlorid
R	resistent
RKL	Rotklee
S	anfällig
SAS	Statistical Analysis System
SG	Sommergerste
SNK	Student-Newman-Keuls
<i>spec.</i>	<i>species</i>
SRAP	Sequence Related Amplified Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
V	Vorstufe (Saatgutvermehrung)
<i>var.</i>	<i>varietas</i>
VVF	Vorvorfrucht
WDH	Wiederholung
WG	Wintergerste
WKL	Weißklee
WR	Winterroggen
WRA	Winterraps
WSC	Wiesenschwingel
WT	Wintertriticale
WW	Winterweizen

# 1 Einführung

## 1.1 Gegenstand, Ziele und Aufgabenstellung des Projektes, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen des BÖLN

Als stickstofffixierende Leguminose und proteinreiches Grundfutter spielt Rotklee im organischen Landbau zur Erhaltung intakter Agrarökosysteme eine zentrale Rolle. In den letzten Jahren gab es jedoch vermehrt Hinweise auf ein durch Phytopathogene bedingtes Ausfallen von Rotkleepflanzen in Rein- oder Mischbeständen mit Futtergräsern (BERENDONK, persönliche Mitteilung). Diese Begebenheit wurde bereits in früheren Jahren aus der Schweiz berichtet (BOLLER ET AL. 1998, SCHUBIGER ET AL. 2003a und 2003b, SUTER ET AL. 2002). Besonders samenbürtige Krankheiten könnten vor allem im ökologischen Landbau eine Schwierigkeit darstellen, da anders als im konventionellen Anbau keine chemischen Beizmittel oder Pflanzenschutzmittel während der Saatgutproduktion eingesetzt werden können. Für die Ertragssicherheit im Rotklee-Anbau müssten daher resistente Sorten eingesetzt werden.

Mit diesem Forschungsvorhaben soll durch die Entwicklung geeigneter Selektionsverfahren für samen- und bodenbürtige Pilzkrankheiten ein Beitrag zur nachhaltigen Sicherung der Saatgutverfügbarkeit von Rotklee sowie der damit verbundenen Grundfutter- und Stickstoffversorgung sowie Beikrautregulation durch den im ökologisch wirtschaftenden Betrieben essentiellen Klee-Anbau geleistet werden.

Durch die Identifizierung und Entwicklung resistenter Sorten wird dazu beigetragen, Rotklee für den Anbau zu erhalten und somit die Wettbewerbsfähigkeit v.a. ökologisch wirtschaftender Betriebe zu bewahren und eine nachhaltige Versorgung mit Viehfutter und Stickstoff zu gewährleisten. Aber auch für konventionell wirtschaftende Betriebe lohnt sich der Anbau von Rotklee in Hinblick auf diese Faktoren. Durch den Einsatz von resistenten Sorten im konventionellen Anbau kann der Einsatz chemischer Beiz- und Pflanzenschutzmittel verringert werden.

## 1.2 Planung und Ablauf des Projektes

Eine künstliche Inokulationsmethode für Resistenzprüfungen zum Südlichen Stängelbrenner an Rotklee wurde von SCHUBIGER ET AL. (2003a und 2003b) etabliert. Für die Pilzkrankheit Kleekrebs existieren in der Literatur bereits zahlreiche Ansätze zur Entwicklung künstlicher Inokulationsverfahren. In diesem Forschungsvorhaben wurde eine Methode nach CARR UND DAVIES (1950) geprüft und optimiert. Nach Abschluss des Schwerpunktes der Erregersammlung in 2009 und 2010 wurde *Phoma spec.* für weitere Infektionsversuche ausgewählt.

In den in 2009 und 2010 auf ökologisch bewirtschafteten Flächen angelegten Freilandversuchen sollten Rotkleesorten und -zuchtstämme hinsichtlich ihrer Resistenz und Persistenz bewertet werden. Bei einem Auftreten von Pathogenen sollten die Ergebnisse aus diesen Versuchen mit den Ergebnissen aus den Gewächshausresistenztests verglichen werden.

Für die molekularen Markeranalysen zur Vererbung der Anthracnoseresistenz wurden spaltende Populationen erzeugt. Nach deren Prüfung im Gewächshausresistenztest wurden Mikrosatelliten und SRAP-Marker (Sequence Related Amplified Polymorphism) angewandt. Diese Analysen konnten durch einen Forschungsaufenthalt an und mit der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon realisiert werden.

## **2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Über das Auftreten von samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten an Rotklee gibt es kaum Erhebungen. Die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse geben einen Anhaltspunkt zu deren Vorkommen und Bedeutung im ökologischen und konventionellen Landbau.

Die Pilzkrankheit Kleekrebs (*Sclerotinia trifoliorum*) ist bereits seit langem dafür bekannt, in Rotkleebeständen für das Ausfallen von Pflanzen verantwortlich zu sein. Die Schäden werden hier im Frühjahr nach der Schneeschmelze sichtbar. In der Rotkleezüchtung findet diese Krankheit in Deutschland seit langer Zeit Beachtung. Allerdings wird berichtet, dass ein Auftreten im Freiland nicht in jedem Jahr beobachtet werden kann, was die Selektion resistenter Genotypen für die Züchtung erschwert. Deswegen gab es bisher bereits zahlreiche Ansätze zur Entwicklung geeigneter künstlicher Inokulationsverfahren, mit deren Hilfe Sortenunterschiede ermittelt und resistentes Material selektiert werden kann. Bisher zeigten jedoch alle diese Testverfahren Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde das o.g. Verfahren geprüft und optimiert.

Erst seit neuerer Zeit ist die Krankheit Anthracnose, hervorgerufen durch *Colletotrichum trifolii*, in Deutschland bekannt. In der Schweiz wurde ein Auftreten hier bereits früher beobachtet (BOLLER ET AL. 1998) und daraufhin ein Selektionsverfahren mittels künstlicher Inokulation entwickelt (SCHUBIGER ET AL. 2003a und 2003b). Dieses Verfahren wurde an die an der LfL vorhandene Technik angepasst und für einen hohen Durchsatz optimiert. Auf dessen Basis konnte ein Sortenranking hinsichtlich der Anthracnoseresistenz der in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten erstellt werden.

Das Inokulationsverfahren mit *Phoma spec.* wurde erstmals angewendet.

Die paarweise Verkreuzung von Rotkleepflanzen wurde in diesem Forschungsprojekt für größere Umfänge optimiert. Die molekulargenetischen Analysen zur Vererbung der Anthracnoseresistenz konnten auf bereits entwickelte Marker aus der Literatur (SSRs: KÖLLIKER ET AL. 2006, SRAPs: ZHANG ET AL. 2011) aufgebaut werden.

### 3 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

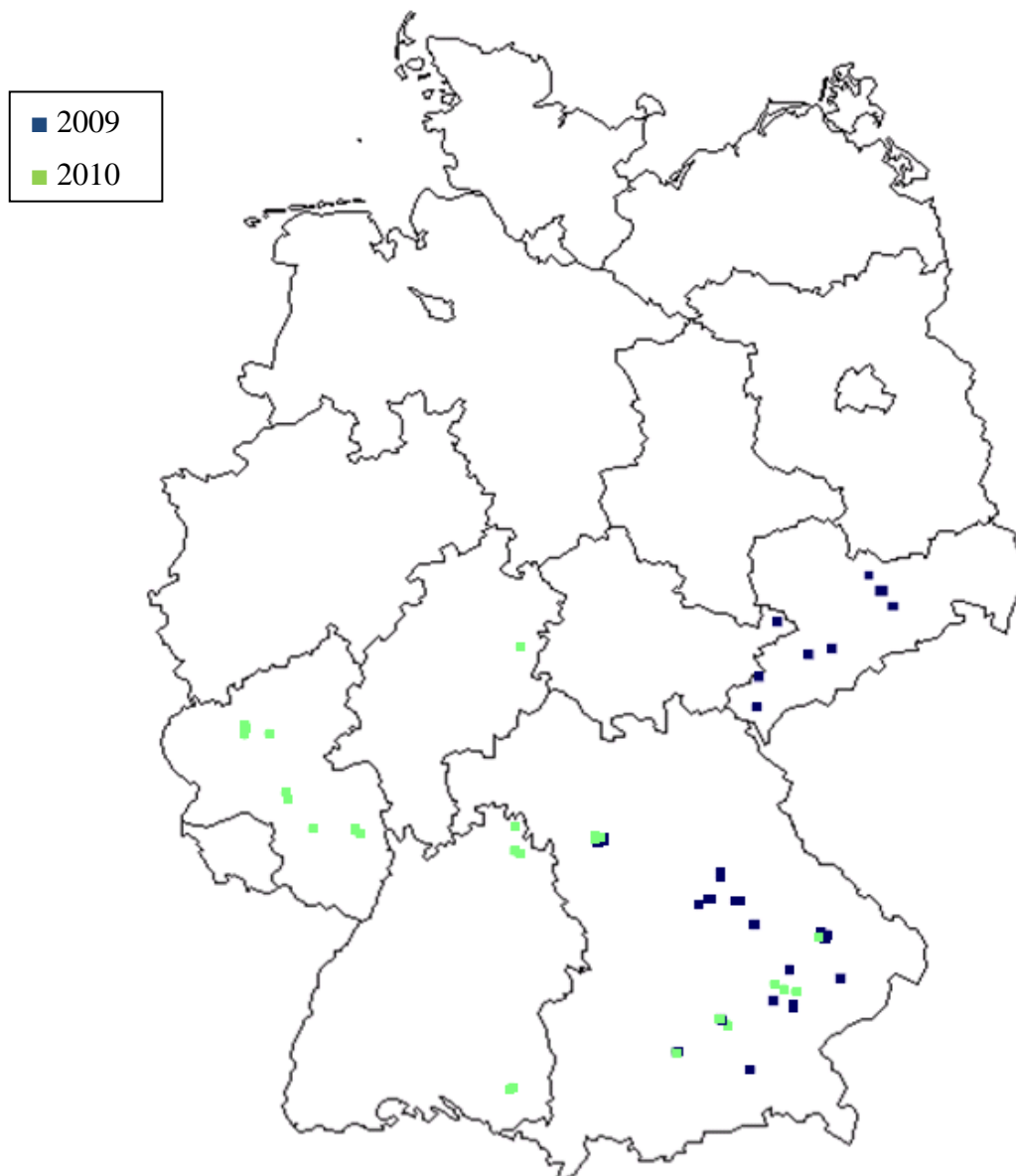
#### 3.1 Erregersammlung

Ziel:

Mit diesen Erhebungen sollte ein Überblick über die in Deutschland tatsächlich an Rotklee auftretenden Krankheitserreger geschaffen werden.

Material und Methoden:

In den Vegetationsperioden der Jahre 2009 und 2010 wurden insgesamt 124 Pflanzenproben hauptsächlich von Flächen zur Saatgutproduktion und aus Versuchspartellen entnommen (s. Abb. 1).



**Abb. 1:** Erregersammlung 2009 und 2010.



Es wurden Pflanzen mit verschiedenen Krankheitssymptomen gesammelt. Es traten hierbei verschiedene Nekrosen an Blättern und/oder Stängeln auf (Abb. 2 und Abb. 3).



Abb. 2: Nekrosen an Rotkleeblättern.



Abb. 3: *Leptosphaerulina trifolii* an Luzerne.

Der Hauptanteil der Proben wurde in den Sommer- bis Spätsommermonaten gesammelt (insgesamt 90 Proben). Im Frühjahr der beiden Jahre wurden 34 Proben gesammelt. Im Jahr 2011 wurden sieben Rotkleepflanzen hinsichtlich ihres Befalls mit Krankheitserregern untersucht. Vier der sieben Proben stammten von ökologisch bewirtschafteten Flächen. Die Proben wurden von Versuchsanstellern und von Beratern der ökologischen Erzeugerringe eingesandt bzw. selbst gesammelt. Es handelte sich dabei um Pflanzen, die mit Verdacht auf Befall mit Anthracnose eingesandt oder gesammelt wurden. Drei dieser Proben stammten aus einem Pflanzenschutzmonitoring, welches die LfL (Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz, Institut für Pflanzenschutz) zusammen mit den ökologischen Erzeugerringen des LKP (Landeskuratorium für pflanzliche Erzeugung in Bayern e.V.) durchführt. Zwei weitere Proben wurden von einer Versuchsstation in Hessen eingesandt. Desweiteren stammte je eine Probe von dem Rotklee-Freilandversuch in Viehhausen sowie von einer Versuchsanlage der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon in Zürich.

Die Besichtigung der Rotklee Flächen und Sammlung der Pflanzenproben wurde in enger Zusammenarbeit mit den Landesstellen der Saatgutenerkennung, mit den Versuchsanstellern landwirtschaftlicher Wertprüfungen, mit Beratern ökologischer Erzeugerverbände sowie mit Vermehrungsberatern von Züchtungsunternehmen durchgeführt (LfL Freising, AELF Deggendorf, AELF Regensburg, AELF Würzburg, LTZ Augustenberg, LAZBW Aulendorf, Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen, Landwirtschaftskammer Rheinland-Pfalz, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Naturland, Bioland, Saatzucht Steinach).

Zur Sammlung wurde Datum, Ort bzw. Koordinaten, Sorte, Bewirtschaftungsform sowie in einigen Fällen Höhenmeter (m über NN) und Vorfrucht tabellarisch erfasst. Da bereits bekannt ist, dass auch Luzerne von Rotkleeerkrankungen (bspw. *C. trifolii*) befallen werden kann, wurden auch Luzerne- und Weißkleepflanzen in die Sammlung integriert.

Die Pflanzen/Pflanzenteile wurden in Papiertüten in einer Kühlbox mit Kühlakkus transportiert. An der Forschungsanstalt für Gartenbau Weihenstephan im Labor für Pflanzenschutz wurden die Pflanzenproben untersucht. Befallene Pflanzenteile wurden auf

Agarplatten ausgelegt (bspw. PDA, Gemüsesaftagar) oder in einer Feuchtekammer weiterbeobachtet. Die Bestimmung der Schadpilze erfolgte dann anhand der gebildeten Sporen und Fruchtkörper an der Forschungsanstalt für Gartenbau Weihenstephan sowie ergänzend am Institut für Pflanzenschutz der LfL (IPS 2a, Dr. Peter Büttner).

#### Ergebnisse:

Die identifizierten Erreger sind in Tab. A1 dargestellt.

Nicht von allen Erregern konnten Reinkulturen gewonnen werden.

#### Zusammenfassung:

Auffallend war der überwiegend gesunde Zustand der beprobten Rotklee-Vermehrungsflächen in Bayern, Sachsen, Thüringen, Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz. Größere Ausfälle, die auf ein Auftreten von Pathogenen hingedeutet hätten, wurden, auch nach Aussagen der Vermehrer selbst und der zuständigen Feldbesichtiger, nicht beobachtet.

Auf den Versuchsflächen hingegen scheint der Befallsdruck mit *C. trifolii* höher zu sein. In Bayern, Baden-Württemberg und Hessen wurden Rotkleeproben von verdächtigen oder bereits für die Krankheit bekannten Flächen entnommen. Im Labor konnte *C. trifolii* nachgewiesen werden.

Gründe für den erhöhten Krankheitsdruck auf den Versuchsflächen sind zum einen der Anbau mehrerer verschiedener Saatgutherkünfte auf kleiner Fläche und die damit verbundene höhere Wahrscheinlichkeit, befallenes Saatgut anzubauen, zum anderen die in einigen Fällen wiederkehrende Nutzung der Flächen als Versuchsstandort. Auch der räumliche Abstand zu anderen Versuchen, in denen Rotklee angebaut wird, ist unter Umständen geringer als in der Praxis üblich.

Von den in 2011 mit einem konkreten Verdacht auf Anthracnose (*C. trifolii*) eingesandten Pflanzenproben konnte an sechs der sieben Proben Pilze der Gattung *Colletotrichum* nachgewiesen werden.

Bei der Isolierung und Erhaltung speziell von *Colletotrichum trifolii* traten Schwierigkeiten auf. Dies kann darin begründet liegen, dass der Großteil der Pflanzenproben von Flächen zur Saatguterzeugung stammt. Diese Pflanzenbestände sind in einem vergleichsweise späteren Entwicklungsstadium, da hier im Vergleich zu Futterbeständen keine regelmäßigen Rückschnitte erfolgen. So kommt es, dass zu einem großen Teil lagernde Pflanzen beprobt wurden, die einen hohen Besatz mit saprophytischen Pilzen aufwiesen. Diese Pilze machten eine Identifizierung und besonders eine Kultivierung weiterer Krankheitserreger schwierig. Desweiteren scheint *C. trifolii* oftmals zusammen mit einem weiteren Pilz der Gattung *Colletotrichum* aufzutreten. *C. destructivum* tritt ebenfalls an Futterleguminosen auf, scheint aber weitaus weniger aggressiv zu sein als *C. trifolii* (SCHUBIGER ET AL. 2003a). Eine besondere Schwierigkeit besteht weiterhin darin, Pilze bei der Isolation aus dem Pflanzengewebe heraus nicht zu verletzen und dabei die Oberfläche des Blattes oder des Stängels trotzdem ausreichend zu sterilisieren (DIJKSTRA 1964).

### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M1: AP1/2: Ende Dezember 2009 sind > 50 Rotkleeproben gesammelt und das vorhandene Pathogenspektrum isoliert worden. Die Pilze sind in Reinkultur genommen worden.

M2: AP1/2 Ende Dezember 2010 sind weitere > 20 Rotkleeproben gesammelt und das vorhandene Pathogenspektrum isoliert worden. Die Pilze sind in Reinkultur genommen worden.

Im Jahr 2009 wurden insgesamt 68 Pflanzenproben von Rotklee Flächen entnommen. Der angestrebte Gesamtprobenumfang von > 50 Rotkleeproben wurde somit deutlich erreicht.

Davon belief sich der Anteil der Proben von ökologisch bewirtschafteten Flächen auf 57,4 %, was knapp unter der Zielsetzung von 66 % liegt.

Im Jahr 2010 wurden insgesamt 56 Pflanzenproben von Praxis- und Versuchsflächen entnommen. Der angestrebte Probenumfang von > 20 Proben wurde somit entscheidend übertroffen.

Die Proben stammten in erster Linie von Flächen zur Saatgutproduktion, aber auch von Futter- und Versuchsflächen. Neben Rotklee wurden auch andere Futterpflanzen in die Sammlung mit einbezogen (Weißklee, Luzerne). Über die Hälfte der gesammelten Proben (61 %) stammte von Flächen, die ökologisch bewirtschaftet werden.

Damit wurde das Ziel, dass mindestens 66 % der zu sammelnden Pflanzenproben von ökologisch bewirtschafteten Flächen stammen sollen, nicht ganz erreicht. Dies liegt zum einen daran, dass Versuchsflächen zumeist auf konventionell bewirtschafteten Flächen angelegt werden. Zum anderen ist es aber auch darin begründet, dass in anderen Bundesländern der Anteil ökologischer Rotklee Vermehrungen am Gesamtanteil geringer ist als in Bayern, wo der Anteil inzwischen 50 % an den Gesamtvermehrungen deutlich überschreitet.

## 3.2 Künstliche Infektionen

### 3.2.1 *Colletotrichum*-Resistenztest

#### Ziele:

Bereits vorhandene Anthracnoseresistenztests sollten hinsichtlich der Wiederholbarkeit ihrer Ergebnisse getestet und gegebenenfalls optimiert werden.

Die in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten sollten hinsichtlich ihrer Anfälligkeit bzw. Resistenz gegen den Erreger *C. trifolii* evaluiert und resistente Sorten für den Anbau und die Züchtung benannt werden. Desweiteren sollten aus dem Resistenztest überlebende Pflanzen zur Erzeugung von Ausgangsmaterial für die Züchtung neuer, gegen Anthracnose resistenter Sorten gewonnen werden können.

#### Material und Methoden:

Der Resistenztest wurde nach einer Methode von SCHUBIGER ET AL. (2003a und 2003b) durchgeführt. Der schematische Ablauf ist in Abb. 4 dargestellt. Dieser Test wurde in Voruntersuchungen auf seine Wirksamkeit hinsichtlich der Unterscheidbarkeit von Sortenunterschieden geprüft und die Technik der Sprühinokulation mittels Gießgestänge und Druckluft optimiert und etabliert.

#### *Pflanzenanzucht*

Die Samen wurden zwei Tage in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier vorgekeimt. Danach wurden die Keimlinge in Erde pikiert. Hierfür wurden Quickpots™ verwendet, so dass die Pflanzen in einem definierten Abstand zueinander angezogen werden konnten. Jede Pflanzschale enthielt 300 Pflanzen. In jeder Schale befanden sich zwei Rotkleesorten, die durch eine Reihe einer anfälligen und

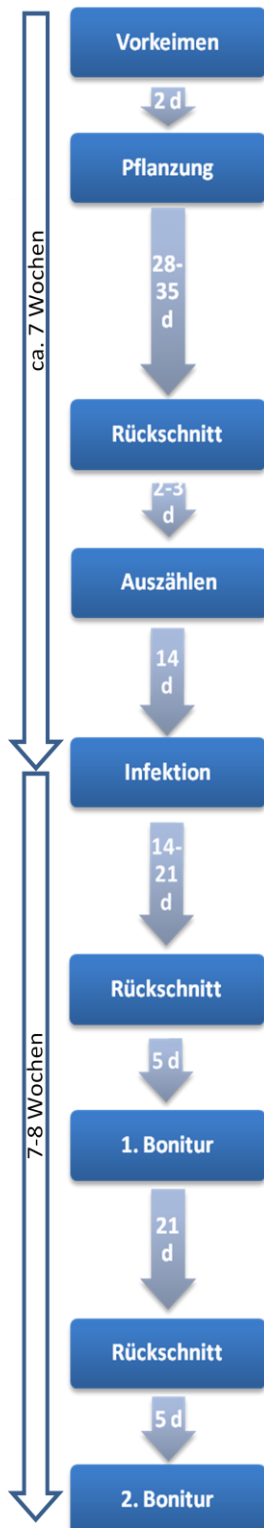


Abb. 4: Ablaufschema Anthracnoseresistenztest.

einer resistenten Kontrollsorte („Titus“ und „Starfire“, Resistenztest 2009/2010) bzw. durch eine Doppelreihe einer anfälligen Kontrollsorte („Titus“, Resistenztests 2010/2011, 2011/2012) voneinander abgegrenzt waren.

Jede Sorte wurde vierfach wiederholt, so dass 540 Einzelpflanzen je Sorte in einer Versuchsserie getestet wurden (Abb. 5). Nach sieben Wochen Wachstumszeit bei 22/20 °C wurden die Pflanzen zurückgeschnitten. Vor der Inokulation wurde die tatsächliche Anzahl der Pflanzen erfasst.

#### *Pilanzucht und –vermehrung*

Das Pilzmaterial wurde von Dr. Franz Xaver Schubiger, Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, bereitgestellt. Es handelte sich jeweils um acht verschiedene Isolate von *C. trifolii*. Die Sporen und Sporenlager des Pilzes wurden von den PDA-Platten abgeschabt und in destilliertem Wasser auf eine Konidiendichte von  $3 \times 10^6$  Sporen/ml eingestellt.

#### *Inokulation*

Die Inokulation des Pflanzenmaterials erfolgte mittels Sprühinfektion. Die Konidiensuspension wurde mit einem Tropfen Tween pro Liter versetzt und mit einem speziell für diese Inokulation genutzten Gießgestänge und einer Druckluftflasche (2 bar) ausgebracht. So kann eine gleichmäßige Geschwindigkeit (6 km/h) eingestellt und damit eine über alle Wiederholungen des Versuches gleichmäßige Menge an Suspension ausgebracht werden. Nach der Inokulation wurde der Versuch mit einer PVC-Plane für sechs bis sieben Tage abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit im Pflanzenbestand und damit eine sichere Etablierung der Krankheit im Bestand zu gewährleisten (Abb. 6).

Bereits nach ca. 14 Tagen können erste Symptome an den Pflanzen beobachtet werden (Abb. 7). Im weiteren Verlauf wurden die Pflanzen zweimal zurückgeschnitten. Außerdem erfolgte eine Zwischenbonitur (s. Abb. 4).

Nach sieben bis acht Wochen wurde der Versuch mit der abschließenden Bonitur beendet.

#### *Bonituren*

Bei den Bonituren wurde die Anzahl überlebender Pflanzen erfasst.

#### *Statistische Auswertung*

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde eine Varianzanalyse gewählt. Das eingesetzte Software-Paket war SAS 9.2.



**Abb. 5:** Anthracnoseresistenztest 2010 mit Rotklee und weiteren Futterleguminosen.



**Abb. 6:** Inkubation unter einer PVC-Plane.



**Abb. 7:** Mit *C. trifolii* befallene Pflanze.

### Ergebnisse:

Die Ergebnisse des Resistenztests aus vier Versuchswiederholungen zeigen eine deutliche Unterscheidbarkeit der Rotkleearten hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegen *C. trifolii*. Als resistensteste der in Deutschland im Projektzeitraum zugelassenen Sorten wurde „Pavo“ ermittelt. Bei dieser Sorte überlebten im Mittel über alle Versuchsjahre 84,8 % der Pflanzen. Sie zeigte in den Untersuchungen ein vergleichbares Resistenzniveau wie die US-amerikanische Sorte „Starfire“, die eine bekannte Resistenz gegen den Südlichen Stängelbrenner besitzt. Die Sorte „Kvarta“ besaß mit einer Überlebensrate von 30,8 % die geringste Resistenz gegen *C. trifolii*.

### Zusammenfassung:

Durch die mittels des Resistenztests erzielten Ergebnisse lassen sich erste Aussagen zur Anfälligkeit der verschiedenen Rotkleearten treffen (JACOB ET AL. 2010a und 2010b). Diese ersten Ergebnisse müssen mit geeigneten Erkenntnissen aus dem Freiland verglichen werden, um gesicherte Aussagen zum Verhalten der jeweiligen Sorten bei einem Befall mit *C. trifolii* unter Freilandbedingungen treffen zu können.

### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M3: AP3 Im vierten Quartal 2009 sind auswertbare Infektionstests für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* durchgeführt und optimiert worden.

M5: AP4 Bis März 2010 sind die ersten Sortentestungen für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* abgeschlossen.

M6: AP4 Bis März 2011 sind die zweiten Testungsreihen für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* abgeschlossen.

Die für diese Arbeitspakete geplanten Ziele wurden erreicht.

Zur Ergänzung wurden im Resistenztest 2010/2011 sowie 2011/2012 weitere Futterleguminosen in den Test integriert, um erste Aussagen über die Anfälligkeit dieser Arten gegenüber *C. trifolii* treffen zu können. Eine Veröffentlichung in der Fachliteratur sowohl der Ergebnisse zu dem Sortentest für Rotklee als auch des Resistenztests der weiteren Futterleguminosen befindet sich derzeit in Vorbereitung.

### 3.2.2 *Sclerotinia*-Resistenztest

#### Ziele:

Die Notwendigkeit, einen geeigneten Resistenztest mittels künstlicher Inokulation zu entwickeln, ergibt sich aus der Tatsache, dass der Infektionsdruck von Kleekrebs im Freiland nicht in jedem Jahr gleich stark auftritt und somit eine kontinuierliche Selektion von resistenten Genotypen für die Züchtung nur begrenzt möglich ist.

Mittels geeigneter künstlicher Infektionen sollen zudem die in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten hinsichtlich der Kleekrebsresistenz charakterisiert werden. Die Ergebnisse des Resistenztests sollen mit Ergebnissen aus dem Freiland verglichen werden.

#### Material und Methoden:

Der Resistenztest für *Sclerotinia trifoliorum* wurde nach einer modifizierten Methode von CARR UND DAVIES (1950) durchgeführt. In jedem Jahr wurden zwei Versuchsanlagen zeitversetzt angelegt.

Je Versuchsserie wurden 27 bzw. 26 Rotkleesorten getestet. Dies entspricht der Anzahl an Rotkleesorten, die zum Zeitpunkt der Versuche in Deutschland zugelassen waren. Die Sorte „Elanus“ konnte aufgrund von Saatgutlieferschwierigkeiten 2010/2011 nicht getestet werden.

Tab. 1 und 2: Versuchsglieder im *Sclerotinia*-Resistenztest 2009/2010 und 2010/2011.

<u>Nr.</u>	<u>Sorte</u>	<u>Nr.</u>	<u>Sorte</u>
1	Amos	1	Astur
2	Astur	2	Atlantis
3	Atlantis	3	Diplomat
4	Diplomat	4	Global
5	Elanus	5	Harmonie
6	Global	6	Heges Hohenheimer
7	Harmonie	7	Kvarta
8	Heges Hohenheimer	8	Larus
9	Kvarta	9	Lemmon
10	Larus	10	Lucrum
11	Lemmon	11	Magellan
12	Lucrum	12	Maro
13	Maro	13	Mars
14	Mars	14	Merula
15	Merula	15	Milvus
16	Milvus	16	Montana
17	Montana	17	Nemaro
18	Nemaro	18	Odenwälder Rotklee
19	Odenwälder Rotklee	19	Pavo
20	Pavo	20	Pirat
21	Pirat	21	Regent
22	Regent	22	Rotra
23	Rotra	23	Taifun
24	Taifun	24	Tempus
25	Tempus	25	Titus
26	Titus	26	Hurrikan
27	Magellan		

## *Pflanzenanzucht*

### 1. Versuchsjahr 2009/2010

Die Samen wurden drei Tage in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier vorgekeimt. Danach wurden die Keimlinge in Erde pikiert. Hierfür wurde die Erde in den Anzuchtschalen mit einem Stempel bearbeitet, so dass ein gleichmäßiges Pikieren der Pflanzen erfolgen konnte. Jede Pflanzschale enthielt 77 Pflanzen. Jede Sorte wurde siebenfach wiederholt, so dass 539 Einzelpflanzen je Sorte in einer Versuchsserie getestet wurden. Nach sechs bis sieben Wochen Wachstumszeit bei 16 °C wurden die Pflanzen zurückgeschnitten.

Drei Wochen nach dem ersten Rückschnitt wurden die Pflanzen ein zweites Mal zurückgeschnitten. Nach einem Tag wurden die Pflanzen mit dem Erreger inokuliert.

Vor der Inokulation wurde die tatsächliche Anzahl der Pflanzen in jeder Schale ausgezählt.

### 2. Versuchsjahr 2010/2011

Aufgrund der Ergebnisse von 2009/2010 wurden die Pflanzen vor der Inokulation mit verschiedenen Temperaturstufen abgehärtet. Außerdem wurde die Anzuchtphase der Pflanzen im Vergleich zum Vorjahr verlängert.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte bis zum ersten Rückschnitt wie im Versuchsjahr 2009/2010.

Sechs Wochen danach wurden die Pflanzen erneut zurückgeschnitten. Vier Tage später begann die Abhärtung der Pflanzen im Konstanzraum bei 9/6 °C (Tag/Nacht) für sieben Tage (Abb. 8). Um eine Aussage über eine mögliche Auswirkung der Abhärtung auf das Resistenzniveau gegenüber Kleekrebs treffen zu können, erfolgte eine differenzierte Abhärtung der Pflanzen.

Ein Teil der Wiederholungen (WDH I und II) wurde für weitere 13 Tage im Konstanzraum bei 9/6 °C belassen (Variante A), der andere Teil (WDH III bis VII) wurde während dieser Dauer in einer Gefrierzelle tieferen Temperaturen ausgesetzt (1 °C, Variante B). Die gesamte Abhärtungsdauer betrug bei beiden Varianten somit 20 Tage. Die Belichtungsdauer betrug neun Stunden pro Tag.

## *Pilzanzucht und –vermehrung*

Das Kleekrebs-Infektionsmaterial wurde vom Institut für Pflanzenschutz der LfL (Abteilung IPS 2a, Mykologie, Dr. Peter Büttner) bereitgestellt.

Das Material wurde aus jeweils elf Kleekrebs-Isolaten hergestellt. Die Pilze wurden in PVC-Tüten, die als Inkubationsgefäße dienten und mit luftdurchlässigen Styroporstopfen verschlossen waren, auf Getreideschrot vier bis sechs Wochen lang angezogen.

Einen Tag vor der Inokulation wurde das Pilzmaterial bei 25 °C während 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet und anschließend mittels einer Küchenmühle fein gemahlen und gründlich durchmischt.

## *Inokulation*

Jede Pflanzschale wurde mit je 15 g des Infektionsmaterials möglichst gleichmäßig bestreut (Abb. 10). Danach wurden die Schalen mit einem Deckel versehen und für sechs Tage in einen Konstanzraum (10 °C Tag, 6 °C Nacht) gebracht (Abb. 8). Dies soll eine günstige Pilzentwicklung bewirken. Danach wurden die Pflanzen im Gewächshaus weiter beobachtet (Abb. 9).



## *Bonituren*

### 1. Versuchsjahr 2009/2010

Am siebten Tag nach der Inokulation wurde eine erste Bonitur der Einzelpflanzen (tot/lebend) durchgeführt. Am 12. Tag nach der Infektion wurde erneut bonitiert.

### 2. Versuchsjahr 2010/2011

Im Vergleich zum Vorjahr wurden die beiden Versuchsanlagen häufiger bonitiert, um den optimalen Zeitraum der Bonitur besser feststellen zu können. Die Bonituren wurden 11, 13, 19 und 26 Tage nach der Inokulation durchgeführt. Bei der zweiten Versuchsanlage erfolgte eine weitere Bonitur 33 Tage nach der Infektion.

## *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung (Varianzanalyse) der Daten erfolgte mit der Software SAS 9.2.

## Ergebnisse:

### 1. Versuchsjahr 2009/2010

Die Überlebensrate der Pflanzen war in beiden Anlagen gering, wobei zwischen den Wiederholungen erhebliche Schwankungen auftraten. Im Mittel über beide Versuchsanlagen überlebten sieben Tage nach der Infektion 44,5 % der Pflanzen (erste Bonitur), zwölf Tage nach der Inokulation lag die Überlebensrate bei 23,1 % (zweite Bonitur). Bei der zweiten Anlage waren die Ausfälle im Vergleich zur ersten Anlage um 23,3 % (erste Bonitur) bzw. um 8,9 % (zweite Bonitur) höher.

Zwischen den Mittelwerten der Sorte mit den meisten und den wenigsten überlebenden Pflanzen ergaben sich nur geringe Differenzen. Zum Zeitpunkt der ersten Bonitur im Mittel über beide Versuchsanlagen zeigte sich „Mars“ mit 52,3 % überlebender Pflanzen als resistenteste, „Nemaro“ mit 34,8 % als anfälligste Sorte. Bei der zweiten Bonitur zeigte „Astur“ die geringsten Pflanzenausfälle (29,5 % überlebende Pflanzen), wohingegen bei „Odenwälder Rotklee“ mit einer Überlebensrate von 15,6 % die Ausfälle am größten waren. Im Gesamtmittel betrug der Unterschied zwischen der resistentesten und der anfälligsten Sorte nur 15,7 %. Die Unterschiede zwischen den Sorten waren nicht signifikant.

Die Versuchsanlage wurde auch nach der abschließenden Bonitur weiterbeobachtet. Nach 21 Tagen gab es kaum mehr überlebende Pflanzen (Abb. 11).

### 2. Versuchsjahr 2010/2011

Es erfolgte die Auswertung der Daten nach dem vierten Boniturzeitpunkt (26 Tage nach der Inokulation).

Zuerst wurden die Ergebnisse beider Abhärtungsvarianten über alle Sorten verglichen. Bei der Variante A überlebten im Mittel über alle Sorten in der ersten Anlage 38 % der Pflanzen, in der zweiten Anlage 76 %. Bei der Variante B überlebten in der ersten Anlage 41 % der Pflanzen, in der zweiten Anlage waren es 63 % überlebender Pflanzen. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten. Auch der Vergleich beider Varianten für jede Sorte zeigte keinerlei statistische Unterschiede. Im Mittel über alle Sorten und Varianten war die Überlebensrate der ersten Anlage geringer (39,8 %) als die der zweiten Anlage (69,4 %).

**Tab. 3:** Ergebnisse des Kleekrebsresistenztests 2010/2011. Überlebensrate in %, Tukey-Test, P=0,05.

Tukey-Kramer Grouping for Sorte Least Squares Means (Alpha=0.05)							
LS-means with the same letter are not significantly different.							
Sorte	Schätzwert						
Kvarta	70.4968	A					
Larus	67.6532	B	A				
Lucrum	67.6373	B	A				
Atlantis	65.2167	B	A	C			
Magellan	64.8990	B	A	C			
Titus	64.6315	B	A	C			
Harmonie	62.7842	B	D	A	C		
Astur	60.3834	E	B	D	A	C	
Hurrikan	58.0804	E	B	D	A	C	
Maro	56.8973	E	B	D	A	C	
Taifun	55.0800	E	B	D	A	C	F
Mars	53.5798	E	B	D	A	C	F
Heges Hohenheimer	52.9443	E	B	D	A	C	F
Merula	52.5848	E	B	D	A	C	F
Tempus	52.1189	E	B	D	C	F	
Regent	51.4134	E	B	D	C	F	
Odenwälder Rotklee	50.4182	E	B	D	C	F	
Lemmon	48.8642	E	D	C	F		
Pavo	48.7646	E	D	C	F		
Pirat	47.8212	E	D	C	F		
Milvus	45.5745	E	D	F			
Diplomat	44.9059	E	D	F			
Global	42.8162	E	G	F			
Montana	42.2327	E	G	F			
Nemaro	39.8171	G	F				
Rotra	25.2800	G	F				

Dieses Ergebnis wurde in der statistischen Verrechnung abgesichert (SNK, P=0,05).

Generell waren die Ausfälle in diesem Jahr geringer. Zwischen den Wiederholungen einer Sorte innerhalb einer Variante gab es erneut Schwankungen, welche mit fortschreitendem Infektionsverlauf größer wurden.

Im Mittel über beide Anlagen und alle Varianten zur vierten Bonitur variierte die Anzahl überlebender Pflanzen von 25 % (Sorte „Rotra“) bis 71 % (Sorte „Lucrum“). So konnte im Vergleich zum ersten Versuchsjahr die Variabilität zwischen der anfälligsten und der resistantesten Sorte im Mittel auf 46 % gesteigert werden. Bei der statistischen Verrechnung dieser Daten zeigten sich zudem signifikante Unterschiede zwischen den Sorten (Tab. 3). Allerdings treten hierbei starke Überschneidungen der statistischen Gruppen auf. Eine Verbesserung der Sortendifferenzierung bei der Auswertung über alle Varianten im Vergleich zur geringeren Differenzierung bei der Verrechnung getrennter Varianten ergibt sich aus dem erhöhten Stichprobenumfang.

Bei der Auswertung des Mittelwertvergleiches der diploiden und tetraploiden Sorten über alle Varianten und Anlagen zeigte sich für das aktuell

in Deutschland zugelassene Sortenspektrum ein Vorteil tetraploider gegenüber diploider Sorten.

### Zusammenfassung:

Im ersten Versuchsjahr 2009/2010 konnte hinsichtlich einer Differenzierung der Rotkleearten nach ihrer Resistenzeigenschaft gegen *Sclerotinia trifoliorum* keine Aussage getroffen werden.

Bereits CARR UND DAVIES (1950) beobachteten, dass durch diese Infektionsmethode mittels gemahlenem, mit Kleekrebs infizierten Getreideschrot sehr hohe Ausfallraten unter den Rotkleepflanzen zu erwarten sind. Auch DIJKSTRA (1964) beobachtete, dass mit der verwendeten Inokulationsmethode ein ungewöhnlich hoher Befall mit dem Erreger auftreten kann und dass unter langen und schweren Infektionen alle Sorten absterben. Daraufhin wurde zur Optimierung des Resistenztests nach Möglichkeiten in der Literatur gesucht, die die Ergebnisse dieses Resistenztests besser absichern lassen sollten.

Die Schwierigkeit, die Resistenz von Rotklee oder anderen Kleearten gegen Kleekrebs zu beurteilen, zeigt sich in den verschiedenen Ansätzen zur Entwicklung geeigneter Verfahren. Neben der Inokulation der Pflanzen durch gemahlene Myzel, wie in dem in diesem Projekt

realisierten Verfahren, wurden Sprühinfektionen sowohl mit einer Myzel- als auch einer Ascosporensuspension an Pflanzen oder Blattsegmenten sowie Wurzeltauchverfahren geprüft (DELGLOS ET AL. 1997, DIJKSTRA 1964, DIXON UND DOODSON 1974, MARUM ET AL. 1994, ÖHBERG ET AL. 2005, PRATT 1992, VESTAD 1960, VLEUGELS ET AL. 2011, YLI-MATTILA ET AL. 2010). Es wurden mehrfach Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beschrieben.



**Abb. 8:** Pflanzschalen zur Abhärtung bzw. Inkubation im Konstanzraum.



**Abb. 9:** Anlage Kleekrebsresistenztest nach der Inokulation.



**Abb. 10:** Pflanzschale zur Inokulation mit infiziertem Getreideschrot.



**Abb. 11:** Hohe Ausfälle nach der Inokulation 2009/2010, 7 dpi.

Nach ÖHBERG ET AL. (2005) stellt eine Abhärtung der Rotkleepflanzen durch tiefere Temperaturen vor der Inokulation eine Voraussetzung für ein differenziertes Ergebnis hinsichtlich der Kleekrebsresistenz verschiedener Sorten dar. In Untersuchungen wurde festgestellt, dass fast alle Pflanzen, die vor der Inokulation nicht abgehärtet wurden, abstarben. Im Gegensatz dazu konnten durch eine Abhärtung der Pflanzen statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Sorten dargestellt werden.

Die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen bestätigen dieses Ergebnis, da im ersten Versuchsjahr 2009/2010 ohne eine Abhärtung der Pflanzen eine deutlich geringere Überlebensrate zu verzeichnen war als im Jahr 2010/2011 mit einer vorangegangenen Abhärtungsphase. Dass die Variabilität zwischen der anfälligsten und der resistentesten Sorte im Mittel im zweiten Versuchsjahr auf 46 % gesteigert werden konnte, ist sowohl auf die Abhärtung der Pflanzen als auch auf das höhere Pflanzenalter zurückzuführen. Zudem

konnten im zweiten Versuchsjahr Sorteneffekte nachgewiesen werden. Zwischen den beiden in 2010/2011 getesteten Abhärtungsvarianten ließen sich jedoch keine statistisch abgesicherten Unterschiede feststellen, so dass nicht davon auszugehen ist, dass sich eine strengere Abhärtung positiv auf die Resistenz gegenüber Kleekrebs auswirkt.

Beim Vergleich der diploiden mit den tetraploiden Sorten zeigte sich eine höhere Resistenz der tetraploiden Sorten. Die Ergebnisse anderer Untersuchungen variieren in diesem Sachverhalt (VESTAD 1960). Um den Einfluss der Verdopplung des Chromosomensatzes auf die Resistenz gegen Kleekrebs zu bestimmen, ist nach VESTAD (1960) nur ein Vergleich der diploiden mit den davon abgeleiteten tetraploiden Formen sinnvoll. Es zeigte sich, dass tetraploide Familien resistenter waren als die dazugehörigen diploiden Ausgangsfamilien. Auch im Sortenvergleich von DIJKSTRA (1964) erzielten tetraploide Sorten allgemein bessere Ergebnisse als diploide. In Untersuchungen von ÖHBERG ET AL. (2005) stellte sich jedoch kein starker Effekt der Ploidie auf den Resistenzgrad dar. Dort ließ sich allerdings eine Abhängigkeit vom Blühzeitpunkt ausmachen. Spätblühende Sorten waren signifikant resistenter als Sorten mit mittelspäter Blüte. In Freilandversuchen von ÖHBERG ET AL. (2008) waren die geprüften tetraploiden Sorten generell weniger anfällig als die diploiden Sorten. Allerdings verweisen ÖHBERG ET AL. (2008) darauf, dass dieses Ergebnis nicht einem generellen Einfluss der Ploidie unterliegen muss, sondern dass verschiedene andere Faktoren wie die Auswahl der geprüften Sorten, die Variabilität des Erregers sowie Witterungsbedingungen eine Rolle spielen könnten.

Dass noch immer kein geeigneter Resistenztest für Kleekrebs existiert, der eine sichere Klassifizierung von Rotkleesorten erlaubt, zeigt sich darin, dass es immer wieder Bestrebungen gibt, neue Resistenztests zu entwickeln bzw. bestehende Verfahren zu verbessern (bspw. VLEUGELS ET AL. 2011), obwohl Kleekrebs bereits seit langer Zeit als Krankheit an Rotklee bekannt ist und seitdem auf das Merkmal „Kleekrebsresistenz“ gezüchtet wird. Zudem ist bisher ungeklärt, was die Resistenz in Rotklee gegenüber *S. trifoliorum* bedingt (SCOTT 1984). Außerdem ist noch nicht ausgeschlossen, dass es für Kleekrebs keine durch Sorteneinflüsse bedingte Resistenz gibt, sondern die Resistenz einzelner Pflanzen vielmehr vom allgemeinen Zustand der Pflanze abhängt (DIJKSTRA 1964). Auch ein Einfluss der Isolatvariabilität des Pilzes auf die Ergebnisse der Biotests ist möglich, weswegen dieser Faktor in künftigen Resistenztests beachtet werden sollte (VLEUGELS ET AL. 2010).

Aufgrund der geringen Unterschiede der statistischen Gruppierungen der Sorten wurde auf einen Vergleich mit Daten aus Freilandversuchen (bspw. Wertprüfungen) verzichtet. Allerdings ist darauf zu verweisen, dass auch bei diesen Freilandprüfungen nur graduelle Unterschiede zwischen den Sorten hinsichtlich der Kleekrebsresistenz zu verzeichnen sind.

#### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M3: AP3 Im vierten Quartal 2009 sind auswertbare Infektionstests für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* durchgeführt und optimiert worden.

M5: AP4 Bis März 2010 sind die ersten Sortentestungen für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* abgeschlossen.

M6: AP4 Bis März 2011 sind die zweiten Testungsreihen für *Colletotrichum* und *Sclerotinia* abgeschlossen.

Ein bereits für Kleekrebs entwickelter Resistenztest wurde durchgeführt und auf Basis dieser ersten Ergebnisse optimiert. Erste Sortentestungen wurden abgeschlossen, jedoch lässt sich auf Basis dieses Tests nur begrenzt eine Aussage über die Kleekrebsresistenz einer Sorte treffen.

### 3.2.3 *Phoma*-Resistenztest

#### Ziele:

Das Projekt hat es sich zum Ziel gesetzt, weitere wichtige Erreger hinsichtlich ihrer Pathogenität an Rotklee zu testen. Da im Arbeitspaket 1 (Erregersammlung) neben *Fusarium* spec. v.a. *Phoma*-Arten an den Rotkleepflanzen bestimmt wurden, sollte eine künstliche Infektion im Gewächshaus klären, ob *Phoma*-Arten tatsächlich Symptome an Rotklee hervorrufen und Pflanzen sogar zum Absterben bringen können.

Um der Frage nachzugehen, ob es einen Unterschied in der Anfälligkeit der Pflanzen gegen den Erreger hinsichtlich der Pflanzenentwicklung gibt, wurden sowohl mehrere Wochen alte Pflanzen als auch Keimlinge inokuliert.

Desweiteren wurden die verwendeten Pilzisolat an Pflanzen verschiedener Sorten getestet, um einen ersten Hinweis darauf geben zu können, ob im Falle einer Pathogenität des Erregers verschiedene Sorten differenziert reagieren. Hierzu wurden sowohl diploide als auch tetraploide Sorten ausgewählt.

#### Material und Methoden:

##### *Pflanzenanzucht*

##### 1. Versuchsdurchgang

Pflanzenanzucht: Die Samen von vier Rotkleesorten („Pavo“ (2n), „Elanus“ (4n), „Lucrum“ (2n), „Kvarta“ (4n)) wurden drei Tage in Petrischalen mit feuchtem Filterpapier vorgekeimt. Danach wurden die Keimlinge in Erde pikiert. Hierfür wurde die Erde in den Anzuchtschalen mit einem Stempel angedrückt, so dass ein gleichmäßiges Einlegen der Pflanzen erfolgen konnte. In jede Pflanzschale wurden 77 Keimlinge einer Sorte pikiert. Die Wachstumsbedingungen im Gewächshaus betragen 20 °C (Tag) bzw. 16 °C (Nacht). Die Pflanzen wurden nach sechs Wochen zurückgeschnitten, um Lager in den Pflanzschalen zu vermeiden. Nach wiederum vier Wochen wurden die Pflanzen erneut zurückgeschnitten und direkt im Anschluss inokuliert. Außerdem wurden Keimlinge in den Resistenztest integriert, die eine Woche vor der Inokulation in Erde pikiert wurden. Es wurden je Erreger und Sorte zwei Wiederholungen mit Keimpflanzen und vier Wiederholungen mit älteren Pflanzen geprüft.

##### 2. Versuchsdurchgang

Die Pflanzenanzucht wurde wie im 1. Versuchsdurchgang durchgeführt. Die Anzuchtdauer betrug insgesamt 16 statt 10 Wochen.

Es wurden je Sorte sechs Wiederholungen geprüft. Auf einen Keimpflanzentest wurde verzichtet.

##### *Pilzanzucht und –vermehrung*

##### 1. Versuchsdurchgang

Im ersten Tastversuch wurden zwei definierte Isolate des Leibniz-Institutes DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) getestet. Es handelte sich hierbei um ein Isolat von *Phoma medicaginis* (DSM-Nr. 62913) sowie um ein Isolat vom *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (DSM-Nr. 63393). Die Kulturen wurden auf dem

von der DSMZ empfohlenen Nährmedium (Malzextrakt-Pepton-Agar) angezogen und vermehrt.

## 2. Versuchsdurchgang

Im 2. Versuchsdurchgang wurden die vermutlich nicht mehr pathogenen Isolate aus dem 1. Versuchsdurchgang durch im Arbeitspaket 1 gesammelte Isolate (Nr. 34 *Phoma medicaginis* und Nr. 51 *Phoma medicaginis* var. *pinodella*) ersetzt. Die Pilzanzucht und –vermehrung erfolgte wie im vorangegangenen Versuch.

### *Inokulation*

Am Tag der Inokulation wurden die Pilze von den Petrischalen geerntet. Dies erfolgte, indem das gebildete Myzel und die Pyknidien von der Agarplatte geschabt und in destilliertes Wasser überführt wurden. Danach wurde mit Hilfe einer Thomakammer die Anzahl der Sporen bestimmt, um anschließend eine Lösung mit der gewünschten Anzahl der Sporen pro ml herzustellen.

Nach der Anzucht wurden die Pflanzen mit einer Sporensuspension ( $3 \times 10^6$  Sporen/ml im ersten bzw.  $1 \times 10^7$  Sporen/ml im zweiten Versuchsdurchgang, versetzt mit einem Tropfen Tween) mit Hilfe eines Chromatographie-Zerstäubers inokuliert. Es folgte eine Inkubationszeit von sechs Tagen unter einer PVC-Plane. Nach der Inokulation wurden die Pflanzen in einwöchigem Abstand auf Symptome untersucht.



Abb. 12 und Abb. 13: Versuchsaufbau *Phoma*-Resistenztest.

### Ergebnisse:

Es konnten in beiden Versuchsdurchgängen nur vereinzelt Symptome an den Blättern einzelner Pflanzen festgestellt werden. Diese Symptome haben sich im Bestand jedoch nicht weiter verbreitet und schienen die Pflanze auch nicht in ihrer Wüchsigkeit zu beeinträchtigen. Nach einem Rückschnitt zeigte die nachgewachsene Blattmasse der betroffenen Pflanzen keine Symptome mehr.

An den Schnittstellen im Stängelbereich zeigten sich nekrotische Stellen, die sich jedoch nicht weiter verbreiteten.

Die im ersten Tastversuch untersuchten Keimlinge zeigten keinerlei Symptome.

Zehn bzw. acht Wochen nach der Inokulation wurden die Versuche abgebrochen.



**Abb. 14:** Nekrose nach der Inokulation an der Schnittstelle am Stängel.



**Abb. 15:** Typische nekrotische Läsion am Stängel nach der Inokulation.



**Abb. 16:** Blattsymptom nach Inokulation.

### Zusammenfassung:

Auch die eigenen, vergleichsweise frischen Isolate zeigten keine größere Pathogenität als die bereits seit Längerem gelagerten Isolate der DSMZ.

In weiteren Untersuchungen müsste eine größere Anzahl an Isolaten getestet werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob *Phoma* spec. pathogen gegenüber Rotklee ist, oder ob *Phoma*-Arten lediglich zusammen mit anderen Pilzen als Sekundärinfektion auftreten.

Falls Pathogenität nachgewiesen werden könnte, ist zu klären, ob es Unterschiede in der Ausprägung der Symptome an den Pflanzen zwischen verschiedenen Isolaten gibt und ob verschiedene Rotkleearten unterschiedlich auf eine Infektion reagieren.

*Phoma medicaginis* var. *pinodella* tritt an Rotklee und Erbse auf, nicht aber an Luzerne. Luzerne wird von *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* befallen. Dort wurden bereits Sorten- sowie Virulenzunterschiede festgestellt (HOFFMANN UND SCHMUTTERER 1999).

### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M3: AP3 Erste Infektionen mit weiteren Erregern wurden begonnen.

M4: AP3 Bis zum vierten Quartal 2010 sind mindestens 2 weitere, auswertbare Infektionstests entwickelt worden.

M6: AP4 Die ersten Testungsserien für mindestens 2 weitere Pathogene sind abgeschlossen.

Aufgrund der Häufigkeit des Auftretens von *Phoma*-Arten bei der Erregersammlung wurde diese Pilzgattung für einen weiteren Resistenztest an Rotklee ausgewählt. Eine Testungsserie, die die Resistenz verschiedener Sorten gegen den Erreger untersucht, erschien infolge der Ergebnisse der Tastversuche als nicht sinnvoll.

Aufgrund der im Arbeitspaket 1 beobachteten geringen Bedeutung anderer Pilzkrankheiten als *S. trifoliorum* und *C. trifolii* wurde darauf verzichtet, einen vierten Resistenztest zu entwickeln.



### 3.3 Freilandversuche

#### Ziele:

In diesem Arbeitspaket sollten sowohl in Deutschland zugelassene Rotkleesorten als auch Sorten und Stämme aus dem Ausland im Freiland hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Krankheiten und ihrer Persistenz geprüft werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die mit künstlichen Inokulationsverfahren im Gewächshaus erzielten Ergebnisse mit den Beobachtungen in den Freilandversuchen korrelieren.

#### Material und Methoden:

##### *Erste Freilandversuchsserie*

Für die erste Freilandversuchsserie wurde planmäßig im zweiten Quartal 2009 der Versuch auf einer ökologisch bewirtschafteten Fläche im Umfeld der Saatzucht Steinach angesät. Der zur ersten Freilandversuchsserie gehörende Versuch im Umkreis der LfL Freising wurde am 1. September 2009 angelegt, da erst im Spätsommer eine geeignete Fläche aus ökologischer Bewirtschaftung für diesen mehrjährigen Versuch zur Verfügung stand (Abb. 17). Dieser in Hohenkammer angelegte Versuch musste aufgrund starker Schäden durch Auswinterung, Mäuse und Maulwurf im April 2010 umgebrochen und neu angelegt werden. Hierzu erfolgte eine Frühjahrsansaat im zweiten Quartal 2010. Aufgrund der einsetzenden Trockenperiode nach der Aussaat konnte allerdings nur ein schlechter Aufgang verzeichnet werden, so dass im August 2010 eine Nachsaat erfolgte.

##### *Zweite Freilandversuchsserie*

Die zweite Freilandversuchsserie wurde Anfang des zweiten Quartals 2010 angelegt. Dazu wurde am 19.04.2010 ein Versuch nahe der Versuchstation in Viehhausen (Landkreis Freising,

Abb. 18) und ein Versuch im Umfeld der Saatzucht Steinach angesät.



**Abb. 17:** Versuchsanlage in Hohenkammer.



**Abb. 18:** Versuchsanlage in Viehhausen.

### *Standorte*

Die Versuchsstandorte können nach den nächstgelegenen Wetterstationen des Agrar-meteorologischen Messnetzes Bayern (<http://www.lfl.bayern.de/agm/start.php>) beschrieben werden (Tab. 4, Wetterstation Jetzendorf für den Standort Hohenkammer).

Eine Übersicht über die geprüften Sorten gibt

Tab. 5. Je Versuch wurden die Versuchsglieder dreifach wiederholt.

Tab. 4: Beschreibung der Versuchsstandorte.

<b>Wetterstation</b>	<b>Nr. 42, Steinach</b>	<b>Nr. 110, Viehhausen</b>	<b>Nr. 136, Jetzendorf</b>
Regierungsbezirk	Niederbayern	Oberbayern	Oberbayern
Landkreis	Straubing-Bogen (SR)	Freising (FS)	Pfaffenhofen a.d.Ilm (PAF)
Lage			
Höhe über dem Meeresspiegel	350 m	490 m	505 m
geographische Breite	48°58'42"	48°24'04"	48°26'33"
geographische Länge	12°36'44"	11°38'49"	11°24'56"
Standorteinheit	Regensburg-Straubinger Donauau	Oberbayerisches Tertiärhügelland, lößlehmreich	Oberbayerisches Tertiärhügelland, lößlehmreich
langjährige Mittel			
Temperatur	7 °C - 8 °C	7 °C - 8 °C	7 °C - 8 °C
Niederschlag (mm/Jahr)	650 - 800	750 - 800	750 - 800

Tab. 5: Übersicht über die geprüften Sorten.

Sorte	Ploidie	Züchter/Sorteninhaber	Jahr der Zulassung (D)	Bemerkungen
AA 34	4n	Institute of Grassland and Environmental Research (IGER, Großbritannien)	*	
Atlantis	4n	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ)	2005	
CW 20001	2n	Cal/West Seeds (USA)	*	
Diplomat	2n	NPZ	2001	
Elanus	4n	Feldsaaten Freudenberger GmbH & Co. KG	2005	
Formica	2n	Agroscope Reckenholz-Tänikon ART (Schweiz)	*	
Harmonie	2n	NPZ	2007	
Jögeva 433	4n	Jögeva Plant Breeding Institute (Estland)	*	
Larus	4n	Euro Grass Breeding	2000	
Lemmon	2n	Barenbrug Holland B.V. (Niederlande)	2003	
Lucrum	2n	Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG	1968	
Merian	2n	Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO, Belgien)	*	
Merkur	2n	ILVO (Belgien)	*	
Milvus	2n	Euro Grass Breeding	1997	
Nemaro	2n	Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG	1986	
Pavo	2n	Innoseeds bv (Niederlande)	2002	
SB 9501	2n	Snow Brand Seed Co. (Japan)	*	
Taifun	4n	Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG	2004	
Titus	4n	Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG	1994	
Odenwälder Rotklee	2n	ZG Raiffeisen eG	1955	Standort Viehhausen, Steinach I und II
Makimidori	4n	Snow Brand Seed Co. (Japan)	*	Standort Viehhausen, Steinach I und II
Cyklon	4n	OSEVA UNI, a. s. (Tschechien)	*	Standort Viehhausen, Steinach I und II
Varte	4n	Jögeva Plant Breeding Institute (Estland)	*	Standort Hohenkammer, Steinach I und II
Magellan	4n	NPZ	2009	Standort Hohenkammer und Viehhausen
Merula	2n	FELDSAATEN FREUDENBERGER GmbH & Co. KG	2003	Standort Viehhausen und Steinach II
Ilte	4n	Jögeva Plant Breeding Institute (Estland)	*	Standort Hohenkammer und Steinach I
Grassland's Sensation	4n	Agricom (Neuseeland)	*	Standort Steinach I und II
Kvarta	4n	FELDSAATEN FREUDENBERGER GmbH & Co. KG	1983	Standort Viehhausen

\*) keine Zulassung in Deutschland

Für alle vier Versuche wurden die jeweils nötigen Pflegemaßnahmen (mechanische Beikrautregulierung, Schröpfhschnitte, Aufstellen von Sitzstangen für Greifvögel, Walzen) durchgeführt. Vereinzelt traten Schäden durch Mäuse und Maulwürfe auf.

Der Schwerpunkt der durchgeführten Bonituren lag auf dem Erfassen von auftretenden Krankheitserregern.

Eine Ernteerfassung erfolgte jeweils an beiden Standorten im Umkreis der Saatzucht Steinach im Ansaat- und ersten Hauptnutzungsjahr.

### Ergebnisse:

Im Ansaatjahr konnten im 2009 angelegten Versuch zwei, im 2010 ausgesäten Versuch ein Ertragsschnitt durchgeführt werden (Tab. 6).

**Tab. 6:** Trockenmasseerträge im Ansaatjahr.

Prüfglied	Ploidie	Steinach I, Ansaat 21.4.2009						Steinach II, Ansaat 12.5.2010	
		1. Schnitt 27.08.2009		2. Schnitt 22.10.2009		Gesamtertrag 2009		1. Schnitt 15.09.2010	
		absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
		dt/ha	%	dt/ha	%	dt/ha	%	dt/ha	%
Titus	4n	37,63	109	8,98	122	46,61	111	22,09	90
Lucrum	2n	34,68	100	4,46	61	39,14	93	24,18	99
CW 20001	2n	36,06	104	10,40	142	46,45	111	28,34	116
Diplomat	2n	35,41	103	5,72	78	41,13	98	23,69	97
Formica	2n	31,07	90	7,02	96	38,10	91	24,51	100
Harmonie	2n	31,45	91	4,90	67	36,35	87	20,61	84
Lemmon	2n	38,93	113	9,64	131	48,57	116	27,51	112
Merian	2n	34,65	100	7,95	108	42,60	102	26,64	109
Merkur	2n	37,86	110	6,15	84	44,01	105	27,14	111
Milvus	2n	33,95	98	7,46	102	41,41	99	23,23	95
Nemaro	2n	31,23	90	4,46	61	35,70	85	24,77	101
Odenwälder Rotklee	2n	37,36	108	6,91	94	44,28	106	27,52	112
Pavo	2n	31,03	90	9,31	127	40,34	96	24,82	101
SB9501	2n	32,84	95	6,81	93	39,65	95	25,53	104
AA34	4n	40,10	116	6,70	91	46,80	112	24,83	101
Atlantis	4n	34,02	98	7,57	103	41,59	99	23,64	97
Cyklon	4n	38,43	111	8,77	119	47,20	113	23,80	97
Elanus	4n	34,52	100	9,53	130	44,05	105	25,71	105
Grassland's Sensation	4n	37,13	107	11,98	163	49,11	117	27,68	113
Jögeva 433	4n	28,05	81	3,76	51	31,80	76	16,65	68
Larus	4n	32,77	95	9,58	130	42,36	101	25,05	102
Makimidori	4n	34,26	99	8,77	119	43,03	103	19,24	79
Taifun	4n	37,22	108	7,73	105	44,95	107	26,91	110
Varte	4n	28,41	82	1,80	24	30,21	72	23,80	97
Durchschnitt Kernsortiment		34,54	100	7,35	100	41,89	100	24,50	100

Im Mittel über beide Versuche zeigten die beiden Sorten estnischer Herkunft Jögeva 433 und Varte den geringsten Ertrag mit 82 und 89 % bezogen auf den Durchschnitt des Sortiments im Ansaatjahr, jedoch erreichte letztere im Versuch Steinach II einen Relativertrag von nahezu 100 %. Auch „Harmonie“ blieb mit dem Trockenmasseertrag deutlich hinter dem Mittel des Sortiments zurück. Gute Ergebnisse erzielten „Grassland’s Sensation“, „Lemmon“ sowie „CW 20001“ mit mehr als 110 % des Relativertrags.

Tab. 7: Gesamtertrag Trockenmasse, 1. HNJ.

Prüfglied	Ploidie	Steinach I		Steinach II		Mittelwert Steinach I + II	
		absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
		dt/ha	%	dt/ha	%	dt/ha	%
Titus	4n	124,36	107	95,39	89	109,87	98
Lucrum	2n	96,02	82	92,20	86	94,11	84
CW 20001	2n	114,14	98	118,36	110	116,25	104
Diplomat	2n	125,17	107	110,36	103	117,76	105
Formica	2n	112,40	96	104,31	97	108,35	97
Harmonie	2n	120,02	103	111,49	104	115,76	103
Lemmon	2n	128,51	110	110,16	102	119,34	106
Merian	2n	111,67	96	104,22	97	107,94	96
Merkur	2n	115,77	99	103,87	97	109,82	98
Milvus	2n	127,01	109	107,55	100	117,28	105
Nemaro	2n	103,10	88	108,14	101	105,62	94
Odenwälder Rotklee	2n	114,18	98	105,04	98	109,61	98
Pavo	2n	118,75	102	106,72	99	112,73	101
SB9501	2n	115,89	99	124,72	116	120,31	107
AA34	4n	112,41	96	101,67	95	107,04	96
Atlantis	4n	130,93	112	114,11	106	122,52	109
Cyklon	4n	129,49	111	113,93	106	121,71	109
Elanus	4n	116,26	100	111,40	104	113,83	102
Grassland's Sensation	4n	114,73	98	114,40	106	114,56	102
Jögeva 433	4n	98,96	85	85,79	80	92,38	82
Larus	4n	123,68	106	99,79	93	111,73	100
Makimidori	4n	116,38	100	117,12	109	116,75	104
Taifun	4n	131,27	113	118,48	110	124,87	111
Varte	4n	97,32	83	101,15	94	99,23	89
Durchschnitt Kernsortiment		116,60	100	107,51	100	112,06	100

Die Ergebnisse der Ertragserhebung im 1. Hauptnutzungsjahr (Tab. 7) zeigen, dass im Durchschnitt sowohl einige der diploiden als auch der tetraploiden Sorten jeweils über und unter dem Relativertrag von 100 % liegen. Im Mittel erreichen jeweils alle tetraploiden und auch diploiden Sorten einen Relativertrag von 100 %. Dass die tetraploiden Sorten in den hier dargestellten Versuchen im Mittel keine höheren Trockenmasseerträge liefern als die diploiden, kann darin begründet liegen, dass der Anteil ausländischer, und damit weniger an hiesige Verhältnisse angepasster Sorten und Stämme bei den geprüften tetraploiden Sorten

mit 55 % höher ist als bei den diploiden (38 %). Besonders die beiden Sorten „Jögeva 433“ und „Varte“ fallen hierbei negativ ins Gewicht.

Unter den geprüften und in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten überzeugten „Taifun“, „Atlantis“, „Elanus“ (4n) sowie „Lemmon“, „Diplomat“, „Milvus“, „Harmonie“ und „Pavo“ (2n) mit guten Relativerträgen über 100 %.

Tab. 8: Ausdauer und Auftreten von Krankheiten.

Prüfglied	Steinach I					Steinach II			Viehhausen	
	26.8.09	26.8.09	14.4.10	07.4.11	07.4.11	16.8.10	07.4.11	11.4.12	04.9.11	20.3.12
	Mehltau	Kleeschwärze	Kleekrebs	Kleekrebs	Deckungsgrad [%] nach 2. Winter	Anthracnose	Kleekrebs	Deckungsgrad [%] nach 2. Winter	Anthracnose	Deckungsgrad [%] nach 2. Winter
AA 34	2,7	2,0	2,7	2,0	57	3,0	2,3	20	3,0	60
Atlantis	2,7	2,3	3,3	2,0	87	3,0	1,0	60	1,0	83
CW 20001	1,7	2,7	2,0	2,0	77	2,0	2,0	83	1,0	80
Cyklon	2,0	3,0	3,0	1,0	73	3,0	1,0	47	2,0	60
Diplomat	2,3	2,7	2,0	1,0	90	1,0	1,0	80	1,7	60
Elanus	1,7	2,0	2,0	1,0	87	1,0	2,0	94	1,3	73
Formica	2,3	2,0	2,3	1,0	80	3,0	1,0	57	1,7	57
Harmonie	1,7	2,0	2,0	1,0	90	2,0	1,0	88	1,3	70
Ilte	2,3	2,3	3,0	2,0	80	-	-	-	-	-
Jögeva 433	2,3	2,0	2,0	1,0	80	1,0	1,0	70	3,3	47
Kvarta	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	67
Larus	2,3	2,0	2,3	1,0	87	3,0	2,0	77	1,0	73
Lemmon	1,7	1,7	2,0	1,0	90	2,0	2,0	83	1,7	77
Lucrum	3,0	2,3	2,3	1,0	47	3,0	1,0	47	4,7	57
Magellan	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	70
Makimidori	2,0	1,7	3,0	1,0	73	5,0	2,3	67	1,0	47
Merian	1,3	2,0	2,3	1,0	77	2,0	1,0	67	4,0	67
Merkur	2,3	2,0	2,7	1,0	60	1,0	1,0	86	4,0	57
Merula	-	-	-	-	-	2,0	1,0	87	1,3	82
Milvus	2,7	2,3	2,3	2,0	87	3,0	1,0	80	1,7	87
Nemaro	3,0	2,7	2,0	1,0	87	2,0	1,0	63	1,0	70
Odenwälder Rotklee	2,7	2,0	2,7	2,0	67	2,0	1,0	53	3,0	53
Pavo	1,7	2,0	2,0	2,0	83	2,0	2,0	88	1,3	83
SB 9501	2,0	2,0	2,0	1,0	90	2,0	1,0	87	1,0	60
Grassland's Sensation	2,3	2,0	1,7	1,0	87	3,0	2,0	73	-	-
Taifun	2,0	3,0	3,0	1,0	80	2,0	1,0	73	1,3	77
Titus	2,7	2,3	2,0	2,0	73	3,0	1,0	57	2,7	70
Varte	3,0	2,3	3,7	1,0	50	2,0	1,0	13	-	-

An allen vier Versuchsstandorten trat jeweils nur ein geringer Befall mit Krankheiten auf. Eine Differenzierung der Sorten ließ sich kaum feststellen, da oftmals der Krankheitsbefall nur lokal

begrenzt und nicht über die gesamte Fläche verbreitet auftrat. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 aufgelistet.

In Hohenkammer traten keine Krankheiten auf. Durch die Neu- und Nachsaaten an diesem Standort erscheint es als nicht sinnvoll, den Deckungsgrad nach dem zweiten Winter als Maß für die Ausdauer darzustellen. Im Ansaatjahr trat im Versuch Steinach I Befall mit Mehltau (*Microsphaera trifolii*) und Kleeschwärze (*Cymadothea trifolii*) auf. Es konnte allerdings nur eine geringe Differenzierung zwischen den Sorten festgestellt werden. Nach dem ersten und zweiten Winter wurde ein Befall mit Kleekrebs festgestellt. Die Krankheit trat auch im Versuch Steinach II nach dem ersten Winter auf. Auch hier war nur eine geringe Differenzierung zu verzeichnen. Der vergleichsweise hohe Befall der Sorte „Varte“ mit dieser Krankheit kann darauf schließen lassen, dass die Sorte eher an andere Pathogenstämme des Erregers angepasst ist als an in Deutschland auftretende Pathotypen. Im Vergleich zum Winter 2009/2010 scheint der Befallsdruck mit Kleekrebs in 2010/2011 noch geringer gewesen zu sein.

Bereits im Ansaatjahr konnte im Versuch Steinach II ein Auftreten von Anthracnose beobachtet werden. Die Sorte „Makimidori“ zeigte hier den höchsten Befall, wohingegen sie am Standort in Viehhausen keinen Befall mit Anthracnose aufwies. Die unterschiedlichen Ergebnisse zum Befall mit dieser Pilzkrankheit lassen sich auf eine ungleichmäßige Verteilung der Krankheit auf der Versuchsfläche zurückführen.

Das Merkmal „Deckungsgrad nach dem zweiten Winter“ soll für eine Bewertung der Ausdauer der geprüften Sorten herangezogen werden. Es zeigte sich keine Sorte in allen drei Versuchen als besonders positiv oder negativ in ihrer Ausdauer. Jeweils in zwei der drei Versuche fielen „Harmonie“ und „Pavo“ positiv auf, wohingegen der Stamm „AA34“ und „Lucrum“ eher eine geringe Ausdauerleistung aufwiesen. „Varte“ wurde nur in Steinach geprüft, so dass eine Aussage zu diesem Merkmal auch in Hinblick auf die Varianz der Ergebnisse bei den anderen Sorten zusätzlich erschwert wird.

#### Zusammenfassung:

Die Ergebnisse zeigen, dass die Gesamterträge im Ansaatjahr einem großen Einfluss der Witterung und damit Wachstumsbedingungen unterliegen. Im ersten Hauptnutzungsjahr können auch ausländische Sorten und Zuchtmaterial durchaus gute Erträge liefern.

Die Ergebnisse zum Auftreten von Krankheiten bestätigt, dass eine züchterische Selektion auf Resistenzen bezüglich Anthracnose und Kleekrebs an Rotklee im Freiland als schwierig einzustufen und nicht in jedem Jahr zuverlässig möglich ist. Eine Korrelation der Ergebnisse aus diesen Versuchen mit den Ergebnissen der künstlichen Inokulationen scheint aufgrund des geringen Befallsdrucks im Freiland und der damit verbundenen geringen Differenzierung nicht sinnvoll.

Zur Beurteilung der Persistenz der Sorten sind mehrjährige Untersuchungen (Ertragsmessungen über zwei Hauptnutzungsjahre) nötig.

#### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M7: AP5 Im zweiten Quartal 2009 ist die erste Freilandversuchsserie ausgesät worden und die Versuche sind etabliert.



M8: AP5 Im zweiten Quartal 2010 ist die zweite Freilandversuchsserie ausgesät worden und die Versuche sind etabliert.

Alle im Projekt geplanten Freilandversuche wurden angelegt und das Auftreten von Krankheiten wurde beobachtet und bonitiert.

### 3.4 Aufbau spaltender Populationen

#### Ziel:

In diesem Teil des Projektes sollten spaltende Populationen erzeugt werden, die die Grundlage für das folgende Arbeitspaket, die genetische Analyse der Anthracnoseresistenzvererbung, bilden.

#### Material und Methoden:

##### *F1-Generationen*

Zur Erzeugung der F1-Generation wurde folgender Kreuzungsplan erstellt:

CW 20001	x Lucrum	(RxS)
CW 20001	x Diplomat	(RxS)
CW 20001	x Pavo	(RxR)
Pavo	x Diplomat	(RxS)
Pavo	x Lucrum	(RxS)
Lucrum R	x Lucrum S	(RxS)

Um eine möglichst reibungslose Saatgutgewinnung zu ermöglichen, wurde die Auswahl der Sorten auf diploide Formen beschränkt, da diese im Vergleich zu tetraploiden Sorten eine kürzere Blütenröhre aufweisen, die die Bestäubung erleichtern.

Als resistente Sorten (R) wurden „Pavo“ und „CW 20001“, als anfällige Sorten (S) „Lucrum“ und „Diplomat“ ausgewählt. Diese Auswahl basierte auf Ergebnissen aus dem Anthracnose-resistenztest. Der Stamm „CW 20001“ ist nordamerikanischer Herkunft und mit der Sorte „Starfire“ verwandt, die in den USA für ihre gute Resistenz gegen Anthracnose bekannt ist.

Für die Durchführung dieser Kreuzungen wurden mehrere Pflanzen dieser Sorten aus bereits angelegten Feldversuchen entnommen bzw. aus Saatgut angezogen.

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen, mehrmals zurückgeschnitten und unter Natriumdampflampen zu einem möglichst gleichmäßigen Blühzeitpunkt gebracht. Die Pflanzen wurden abhängig von ihrem Entwicklungsstand paarweise unter Isolationskäfigen (BHT 50 x 65 x 50 cm bzw. 50 x 95 x 50 cm) zusammengestellt. Im ersten Kreuzungsdurchgang wurden neben der Bestäubung durch Hummeln auch Handkreuzungen mit Hilfe einer Pinzette durchgeführt.

Zu Blühbeginn wurden je Isolationskäfig, abhängig von der Anzahl der ausgebildeten Blüten, drei bis zehn männliche Erdhummeln (*Bombus terrestris*, Hummelset „Masculino“, Firma renatur) zur Bestäubung eingesetzt. Den Hummeln wurde in den Käfigen in Petrischalen mit Filterpapier eine Honigwasserlösung bereitgestellt, um eine möglichst lange Bestäubungszeit zu gewährleisten. Die Lebensdauer der Erdhummeln betrug ca. drei bis fünf Wochen. Waren alle Hummeln in einem Käfig gestorben und die Blüte des Rotklee noch nicht abgeschlossen, wurden neue Hummeln in den Käfig eingebracht. Nach Blühende wurden die Isolationskäfige entfernt. Die Abreife dauerte nach Blühende ca. acht Wochen. Danach wurden die Blütenköpfe für jede einzelne Pflanze getrennt beerntet und für 24 Stunden bei 30 °C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurden die Samen per Hand ausgerieben.

Im November 2009 wurde mit der Erzeugung der F1-Generationen begonnen. Aufgrund teilweise geringer Samenausbeute wurden die Kreuzungen mit denselben fertilen Paaren wiederholt. Die Ernte der F1-Generationen wurde im August 2010 abgeschlossen. Insgesamt wurden 48 Kreuzungen durchgeführt.



**Abb. 19:** Isolierkäfige im Gewächshaus zur Erzeugung von paarweisen Kreuzungen.

### *F2-Familien*

Aus den F1-Generationen wurden 2011 sieben Kreuzungen ausgewählt, von denen F2-Familien erzeugt wurden. Hierzu wurden ca. 40 Rotkleepflanzen der F1 je Kreuzung angezogen. Aus diesen Pflanzen wurden 20 Pflanzen ausgewählt, die sich in ihrem Entwicklungsstand am ähnlichsten waren. Diese wurden in Isolationskäfigen (BHT 130 x 90 x 110 cm) mit Hilfe von Hummeln (10 bis 20 Hummeln pro Käfig) bestäubt. Die Ernte dieser F2-Familien erfolgte bis November 2011.

### Ergebnisse:

#### *F1-Generationen*

Bereits im ersten Durchgang konnte von 22 der 26 angesetzten Kreuzungen Samen geerntet werden (Tab. 9, dargestellt sind nur fertile Kreuzungen). Um eine Fremdbefruchtung auszuschließen, sollten nur Kreuzungen berücksichtigt werden, bei denen beide Eltern etwa den gleichen Samenansatz aufweisen. Zudem sollten für weitere Beobachtungen im Anthracnoseresistenztest mindestens 200 Samen je Kreuzung geerntet worden sein. Diese

Kreuzungen sind in Tab. 9 grau hinterlegt und wurden im Winter 2010/2011 für ein erstes Screening im Resistenztest angebaut.

**Tab. 9:** Samenernte aus Pärchenkreuzungen.

Kreuzung	Mutter	Ernte Februar 2010		Ernte August 2010	
		Anzahl Samen	Samen Kreuzung gesamt	Anzahl Samen	Samen Kreuzung gesamt
HX1	Lucrum R	31	45	74	90
	Lucrum S	14		16	
X24	Lucrum R	2	62	698	1166
	Lucrum S	60		468	
X25	Lucrum R	217	367	303	738
	Lucrum S	150		435	
X26	Lucrum R	218	253	16	30
	Lucrum S	35		14	
HX5	CW20001	9	26	342	1159
	Lucrum S	17		817	
X15	CW20001	50	87	131	254
	Lucrum S	37		123	
X16	CW20001	124	124	116	136
	Lucrum S	0		20	
X17	CW20001	13	75	441	1394
	Lucrum S	62		953	
X20	CW20001	336	336	0	3
	Lucrum S	0		3	
HX4	Lucrum S	18	28	1470	2245
	Pavo	10		775	
X11	Lucrum S	14	674	38	107
	Pavo	660		69	
X12	Lucrum S	9	11	193	344
	Pavo	2		151	
X13	Lucrum S	8	8	140	222
	Pavo	0		82	
X21	Lucrum S	58	72	120	279
	Pavo	14		159	
HX3	Pavo	15	39		-
	CW20001	24			
X2	Pavo	0	19	57	325
	CW20001	19		268	
X3	Pavo	0	11	9	26
	CW20001	11		17	
X18	Pavo	0	1	153	600
	CW20001	1		447	
X9	Diplomat	138	138		-
	Pavo	0			
X22	Diplomat	1	13	498	697
	Pavo	12		199	
HX2	Diplomat	26	72		-
	CW20001	46			
X19	Diplomat	52	72	13	13
	CW20001	20		0	

HX = Handkreuzung  
X = Hummelkreuzung

(nur Hummelkreuzungen)

## F2-Familien

Die Erträge der Samenernte in g der F2-Familien sind in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Samenernte der F2-Familien.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Samenernte [g]</u>
HX4	6
HX5	2
X12	14,5
X17	11,7
X22	6,1
X24	2,8
X25	6,7

### Zusammenfassung:

Die Kreuzungstechnik in Isolierkäfigen mit Hilfe von Hummeln erwies sich im Gegensatz zu Handkreuzungen als ergiebiger. Jedoch konnte nicht von allen Kreuzungen genügend Samen für weitere Untersuchungen gewonnen werden, so dass nur die Ernte von ca. 25 % der durchgeführten Kreuzungen für weitere Arbeitsschritte (Screening im Resistenztest, genetische Analysen) verwendet werden konnte.

### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M9: AP6 Dezember 2009 gezielte Kreuzungen sind gelungen.

M10: AP7 Juni 2010 Kreuzungen anfällig x resistent sind gelungen.

M11: AP7 Juni 2011 F1 ist zur F2 geselbstet worden oder Geschwister sind erfolgreich gekreuzt.

Da die genetischen Analysen bereits an den F1-Generationen durchgeführt werden konnten, ergab sich für den Projektverlauf kein Nachteil in der zeitlichen Verschiebung der Erzeugung der F2-Familien.

Statt Geschwisterkreuzungen oder Selbstungen der F1 wurden F2-Familien erzeugt, da mit diesen in der verbliebenen Projektzeit eine höhere Anzahl an Nachkommen erzeugbar war. In Kenntnis der im Projekt gewonnenen Informationen zu Infektion und Variabilität des Schadbildes war so eine bessere Absicherung der Ergebnisse zu erwarten.

Die ursprünglich geplanten Ziele dieser Arbeitspakete wurden erfüllt.

### 3.5 Molekulare Marker

#### Ziel:

In den spaltenden Rotkleepopulationen, die in den Arbeitspaketen 6 und 7 erzeugt wurden, soll die Vererbung der Anthracoseresistenz genetisch analysiert werden.

#### Material und Methoden:

Die Phänotypisierung des zu prüfenden Materials sowie die Blattprobenentnahme und –aufbereitung fanden an der LfL in Freising statt. Die genetischen Analysen wurden an der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon, Forschungsgruppe Molekulare Ökologie durchgeführt.

#### *Pflanzenanzucht und Resistenztest*

Zwölf der erzeugten Rotkleepopulationen wurden für ein erstes Screening im Anthracoseresistenztest getestet. Je Population wurden 100 Pflanzen geprüft. Der Ablauf des Resistenztests ist im Abschnitt 4.2.1 dargestellt.

Auf Basis der Ergebnisse dieses ersten Screenings wurden vier Populationen ausgewählt, die mit einer größeren Anzahl an Einzelpflanzen und echten Wiederholungen dieser Pflanzen im Resistenztest geprüft werden sollten. Dies soll eine sichere Aussage über den Phänotyp einer Pflanze ermöglichen und somit eine fundierte Basis für die genetischen Analysen bilden.

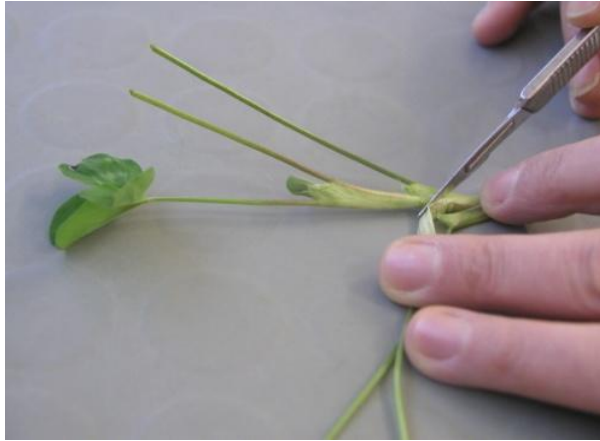
Als Auswahlkriterien dienten das Spaltungsergebnis des ersten Screenings sowie eine ausreichende Anzahl an Samen, die eine Anzucht von mindestens 200 Pflanzen je Population ermöglichte. Es wurden die Kreuzungen „X22“, „X24“, „HX5“ und „HX4“ ausgewählt.

Je Population wurden ca. 250 Samenkörner, die vorher mit Sandpapier für ein besseres Keimverhalten angeschmirgelt wurden, auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen vorgekeimt. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Sämlinge in Erde pikiert. Nach ca. vier Wochen wurden die Pflanzen von den Quickpots™ in größere Pflanztöpfe umgetopft. Nach insgesamt acht Wochen wurden die Pflanzen verklont. Hierzu wurden von den Rotkleepflanzen mit einem Skalpell Stecklinge geschnitten (Abb. 20). Die Stecklinge wurden in Wurzelpulver gestippt und anschließend in eine mit Sand gefüllte Pflanzschale überführt. Nach sieben bis zwölf Tagen konnten die Stecklinge mit ausreichendem Wurzelansatz in Pflanztöpfe gepflanzt werden (Abb. 21). Nach weiteren vierzehn Tagen wurden die überlebenden Stecklinge mit dem Erreger *C. trifolii* inokuliert (siehe Anthracoseresistenztest 4.2.1). Jede Pflanze wurde in dreifacher Wiederholung im Resistenztest geprüft. Abhängig vom Ergebnis (resistent/anfällig) wurden die Proben von Pflanzen mit dem gleichen Phänotyp für eine Bulk Segregant Analysis (BSA) in Gruppen zusammengefasst.

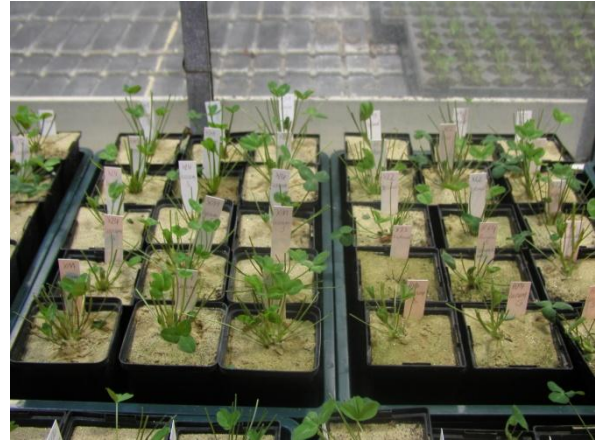
#### *DNA-Extraktion*

Blattproben von jeder Pflanze wurden vor dem Resistenztest entnommen, bei -80 °C gelagert und anschließend gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Blattproben wurden in einer Retschmühle bei 60 Hz während zwei Minuten mit einer Stahlkugel gemahlen. Die DNA-Extraktion erfolgte teilweise aus gepoolten Proben für die BSA und aus Einzelpflanzenproben mit dem NucleoSpin® 96 Plant II Kit von Macherey-Nagel.

Die DNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop1000 bestimmt.



**Abb. 20:** Erzeugung von Rotkleestecklingen.



**Abb. 21:** Rotkleestecklinge.

### *SSR- und SRAP-Protokoll*

Für die genetischen Analysen wurden sowohl die vier Populationen, deren Einzelpflanzenergebnisse an geklonten Pflanzen erhoben wurden, als auch die zwölf Populationen des ersten Resistenztest-Screenings herangezogen.

Insgesamt wurden 108 SSR-Marker getestet. Die Marker stammten aus früheren Arbeiten zu Rotklee an der Forschungsanstalt Agroscope (HERRMANN ET AL. 2008, HERRMANN ET AL. 2006, KÖLLIKER ET AL. 2006).

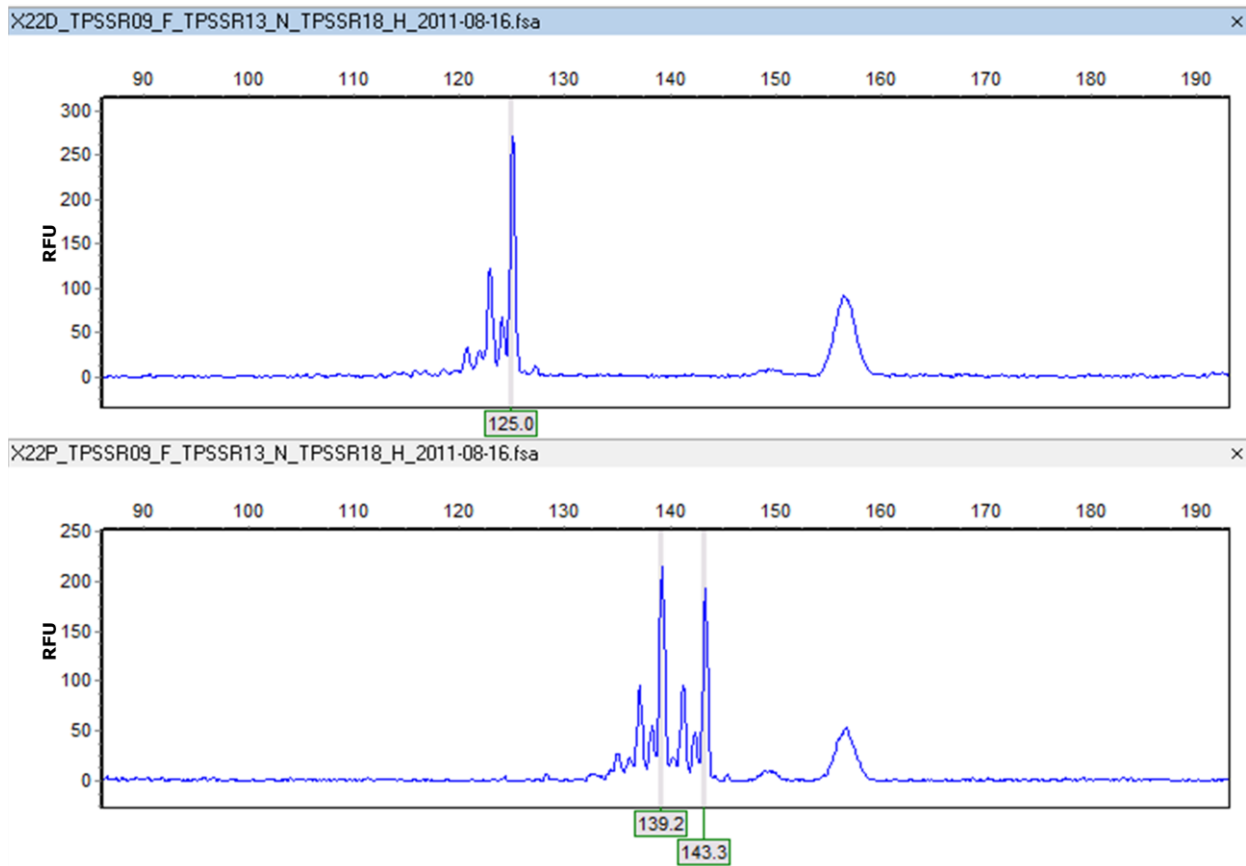
Es wurden 64 SRAP-Primerkombinationen, die der Literatur entnommen wurden (ZHANG ET AL. 2011), getestet.

Die PCR-Reaktionen für die SSR-Analysen wurden nach HERRMANN ET AL. 2006 mit je 15 ng DNA in einer Lösung mit 1x GoTaq flexi Puffer und H<sub>2</sub>O, 2,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTP, je 0,2 µM Forward- und Reverse-Primer und 0,5 U Polymerase GoTaq durchgeführt. Für die SRAP-PCR wurden modifiziert nach LI UND QUIROS (2001) 3 mM MgCl und je 0,25 µM Forward- und Reverse-Primer verwendet.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit einem ABI 3100XL Sequencer. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm GeneMarker<sup>®</sup> V1.91 von SoftGenetics<sup>®</sup> analysiert.

### Ergebnisse:

Von den 108 geprüften SSRs spaltete ein Marker in zwei der geprüften Rotkleepopulationen (X12, X22) bezüglich des Merkmals „Anthracoseresistenz“ in der BSA auf (Abb. 22). Infolgedessen wurde dieser Mikrosatellit auch an den Einzelpflanzen dieser Populationen getestet. Diese Analysen bestätigten das Ergebnis der BSA, dass der Marker eng mit der Anthracoseresistenz gekoppelt ist.



**Abb. 22:** Elektropherogramm des Markers TPSSR09 an den Elternpflanzen der Population X22. Oben: resistenter Elter, unten: anfälliger Elter.

Von den 64 SRAP-Primerkombinationen wurden acht Marker ausgewählt, die nach der BSA an Einzelpflanzen der geprüften Populationen getestet werden sollen. Diese weiterführenden Analysen sind derzeit an der Forschungsanstalt Agroscope in Bearbeitung.

### Zusammenfassung:

Eine Darstellung dieser Ergebnisse soll in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht werden.

### Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

M12: AP8 Im vierten Quartal 2010 lassen sich > 20 Molekulare Marker im Rotklee darstellen.

Im 4. Quartal 2011 konnte in zwei der geprüften Rotkleepopulationen ein molekularer Marker identifiziert werden, der eng mit der Resistenz gegen Anthracnose gekoppelt zu sein scheint.

Weiterführende Untersuchungen (Kartierung des Markers TPSSR09, Einzelpflanzenanalyse ausgewählter SRAP-Primerkombinationen) laufen momentan in Zusammenarbeit mit und an der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon, Forschungsgruppe Molekulare Ökologie, Dr. Roland Kölliker. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen in gemeinsamen wissenschaftlichen Veröffentlichungen in der Fachliteratur dargestellt werden.



### 3.6 Kleekrebs-AFLP-Analysen

#### Ziel:

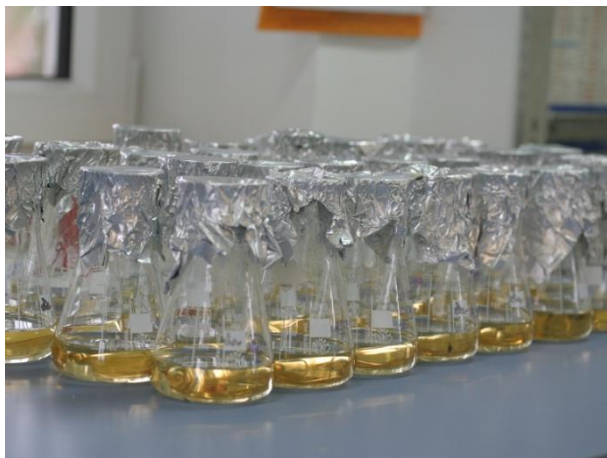
Die in dem Projektzeitraum gesammelten Kleekrebs-Isolate (*Sclerotinia trifoliorum*) sollen mittels der AFLP-Methode genetisch miteinander verglichen werden. Somit sollen Hinweise auf die geografische Verbreitung und Vermischung einzelner Pilzstämme gezogen werden können.

#### Material und Methoden:

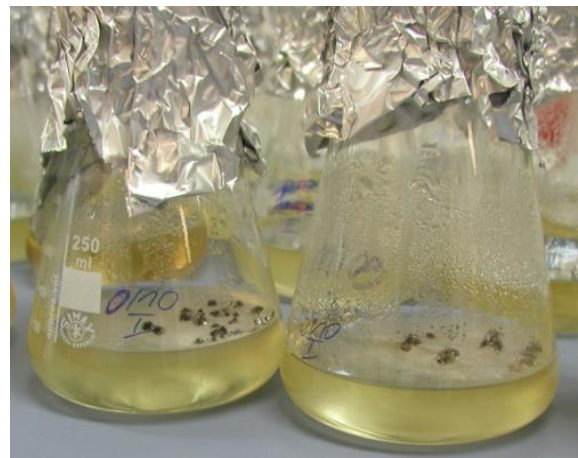
Die Pilzanzucht und -vermehrung wurde an der Forschungsanstalt für Gartenbau der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf durchgeführt. Die DNA-Isolation und AFLP-Analysen erfolgten in der Arbeitsgruppe IPZ 5c (Züchtungsforschung Hopfen, Dr. Stefan Seefelder) der LfL.

#### *Pilzanzucht und Myzelvermehrung*

Aus den in 2009 und 2010 gesammelten Kleekrebs-Isolaten wurden direkt nach der Sammlung mittels einer Verdünnungsreihe Einsporisolate hergestellt, welche bei -80 °C für nachfolgende Analysen gelagert wurden. Zur Pilzanzucht wurden pro Isolat je zwei mit LB-Flüssigmedium gefüllte Erlenmeyerkolben mit einer Sklerotie beimpft. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 14 Tagen konnte das Myzel geerntet werden.



**Abb.23:** Flüssigkultur.



**Abb. 24:** Flüssigkulturen mit Sklerotien und Myzel, 11 Tage nach dem Animpfen.

#### *Myzelernte und Aufbereitung*

Die Ernte des Myzels aus der Flüssigkultur erfolgte durch Abnutschen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Das Myzel wurde in luftdurchlässigen Papiertüten während drei Tagen gefriergetrocknet.

#### *DNA-Isolation*

Das gefriergetrocknete Pilzmaterial wurde in einer Retschmühle mit Hilfe von jeweils zwei Stahlkugeln gemahlen (60 Hz, 1 min). Danach erfolgte die DNA-Isolation mit dem Invisorb® Spin Plant Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin). Die DNA-Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte mit dem NanoDrop1000.

### AFLP-Analysen und Auswertung

Die AFLP-Analysen wurden nach dem Protokoll von HARTL UND SEEFELDER (1998) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software CrossChecker2.

### Ergebnisse:

Je nach verwendeter Primerkombination wurden über die AFLP-Analyse 18 bis 42 auswertbare DNA-Banden generiert.

Acht Primerkombinationen erzeugten insgesamt 49 polymorphe Banden. Im Schnitt erzeugte eine Primerkombination sechs Polymorphismen. Die Kombination P12\_Msp19 brachte elf, P12\_Msp12 hingegen nur zwei Polymorphismen hervor (Tab. 11). Die Fragmentgröße der Polymorphismen lag zwischen 113 und 474 bp. Abb. 25 zeigt zwei Polymorphismen der Kombination E13\_Msp18. Auffällig ist hier besonders, dass die beiden Proben 0/10I und 2/10I von der gleichen Fläche stammen und sich doch genetisch voneinander unterscheiden.

Tab. 11: Anzahl amplifizierter Polymorphismen der verwendeten Primerkombinationen.

<b>Primerkombination</b>	<b>Anzahl Polymorphismen</b>
P13_Msp11	9
P13_Msp13	3
P12_Msp12	2
P12_Msp19	11
E15_Msp14	6
E16_Msp11	6
E11_Msp19	9
E13_Msp18	3

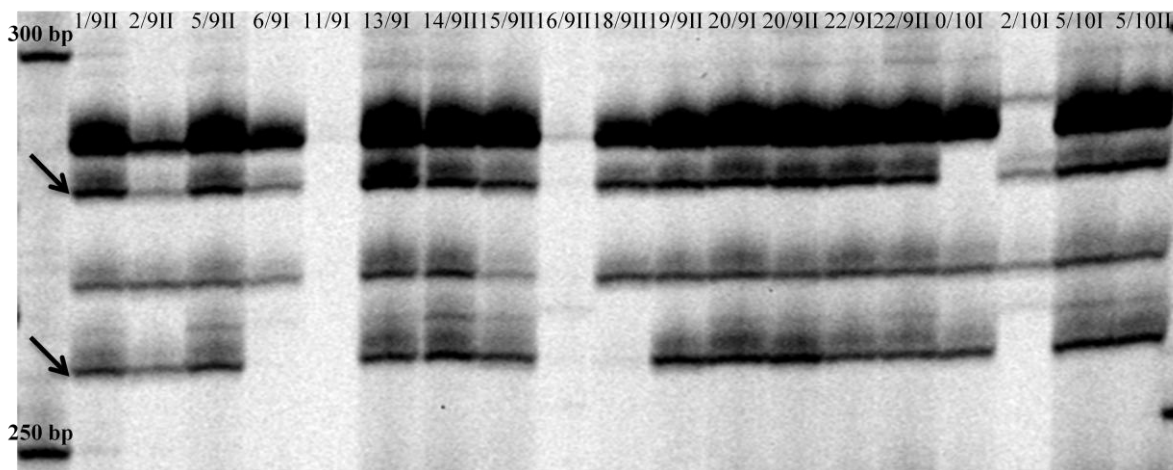


Abb. 25: Polymorphe Banden erzeugt durch E13\_Msp18.

### Zusammenfassung:

Die Ergebnisse zeigen, dass mittels der verwendeten AFLP-Methode Aussagen zu genetischen Unterschieden verschiedener Kleekebs-Isolate dargestellt werden können. Auch Isolate, die

auf der gleichen Fläche gesammelt wurden und deren geografische Herkunft somit sehr nah beieinander liegt, unterscheiden sich in ihrem AFLP-Bandenmuster. Ein Grund hierfür kann die sexuelle Vermehrung des Pilzes sein, allerdings kann auch eine Einschleppung neuer Pilzstämmen auf eine Fläche, beispielsweise durch eine Verunreinigung des Saatgutes mit Sklerotien, dafür verantwortlich sein.

Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen:

Die in dem Projektzeitraum gesammelten Kleekrebs-Isolate (*Sclerotinia trifoliorum*) sollen mittels der AFLP-Methode genetisch analysiert werden. Somit sollen Hinweise auf die geografische Verbreitung und Vermischung einzelner Pilzstämmen gezogen werden können.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die AFLP-Methode für Diversitätsstudien bei Kleekrebs sehr gut eignet.

Um Rückschlüsse auf die geografische Verbreitung und Vermischung einzelner Kleekrebsstämmen ziehen zu können, ist es nötig, die Anzahl und Herkunft der Pilzisolate auf einen größeren geografischen Rahmen auszuweiten sowie die Anzahl der verwendeten Primerkombinationen zu erhöhen. Solche Untersuchungen werden derzeit von VLEUGELS ET AL. (2010) durchgeführt.

#### **4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der erzielten Ergebnisse, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der in diesem Forschungsvorhaben realisierten Erregersammlung lassen erkennen, dass in den beprobten Gebieten Deutschlands besonders die beiden Pilzkrankheiten Kleekrebs und Anthracnose an Rotklee auftreten und die größten Schädigungen hervorrufen können. Weitere Erreger scheinen keinen Einfluss auf die Persistenz der Rotkleebestände zu haben.

Die Ergebnisse des Anthracnoseresistenztests bei Rotklee geben Aussagen über die Anfälligkeit der in Deutschland zugelassenen Sorten und können somit, bei Auftreten dieser Krankheit in einem Gebiet, als Anhaltspunkte für dieses Merkmal in die Sortenempfehlung einfließen und sichern somit die Anbauwürdigkeit von Rotklee auch im ökologischen Landbau.

Durch die Anwendung des Resistenztests konnte außerdem anthracnoseresistentes Material der Arten Rotklee, Luzerne und Perserklee erzeugt werden, welches nun als Ausgangsmaterial an der LfL in Freising züchterisch weiter bearbeitet werden kann. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch rekurrente Selektion das Merkmal „Anthracnoseresistenz“ einer Sorte deutlich verbessert werden kann (unveröffentlichte Ergebnisse). Auch wurden weitere Futterleguminosen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegen *C. trifolii* untersucht (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Ergebnisse daraus werden ebenso Eingang in die Praxisberatung finden.

Aus den molekularen Markeranalysen zur Anthracnoseresistenz steht ein Marker zur Verfügung, der einen ersten Anhaltspunkt zur Vererbung der Resistenz liefern kann. Die Übertragung dieses Markers auf weiteres Zuchtmaterial ist zu prüfen. Außerdem ist mit diesem Marker ein wichtiger Schritt in Hinblick auf die Identifizierung von Resistenzgenen gelungen.

Die in diesem Forschungsvorhaben erzielten Ergebnisse konnten bereits auf Fachtagungen im Rahmen von Vorträgen oder Posterpräsentationen vorgestellt werden (siehe Abschnitt 6). Weitere Präsentationen neuerer Ergebnisse sind in Planung (bspw. Wissenschaftstagung des Ökologischen Landbaus, März 2013, Bonn). Desweiteren sollen einige Ergebnisse in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht werden. Durch die Teilnahme an verschiedenen Arbeitskreisen (siehe Abschnitt 6) sowie den Kontakt mit Vermehrungsberatern, Feldbesichtigern sowie Beratern der Ökoverbände erfolgte ein Wissenstransfer aus dem Forschungsvorhaben in die Praxis.

## 5 Literaturverzeichnis

BOLLER B, BIGLER P, BUCANOVIC I, BÄNZIGER I (1998): Southern anthracnose – a new threat for red clover persistence in cooler regions? In: B. Boller und F.J. Stadelmann (eds): Breeding for a multifunctional agriculture, Proceedings of the 21st meeting of the fodder crops and amenity grasses section of EUCARPIA, Switzerland, 195-198.

CARR AJH, DAVIES DLG (1950): A Technique for the Selection of Red Clover Seedlings Resistant to the Clover Rot Fungus, *Sclerotinia trifoliorum* Eriksson. Nature 165, 1023.

DELCLOS B, MOUSSET-DÉCLAS C, RAYNAL G (1997): A simple method for evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) resistance to *Sclerotinia trifoliorum*. Euphytica 93, 173-179.

DIXON GR, DOODSON JK (1974): Techniques for testing the resistance of red clover cultivars to *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. (clover rot). Euphytica 23, 671-679.

DIJKSTRA J (1964): Inoculation with ascospores of *Sclerotinia trifoliorum* for detection of clover rot resistant red clover. Euphytica 13, 314-329.

HARTL L, SEEFELDER S (1998): Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. Theor Appl Genet 96, 112–116.

HERRMANN D, BOLLER B, STUDER B, WIDMER F, KÖLLIKER R (2008): Improving Persistence in Red Clover: Insights from QTL Analysis and Comparative Phenotypic Evaluation. Crop Science, Vol. 48, 269-277.

HERRMANN D, BOLLER B, STUDER B, WIDMER F, KÖLLIKER R (2006): QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.). Theor Appl Genet 112, 536-545.

HOFFMANN GM, SCHMUTTERER H (1999): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, S. 521.

JACOB I, HARTMANN S, SCHUBIGER FX, STRUCK C (2010a): Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. Grassland Science in Europe, Vol. 15, 344-346.

JACOB I, HARTMANN S, SCHUBIGER FX, STRUCK C (2010b): Resistenz der in Deutschland zugelassenen Rotkleesorten gegen den Erreger des Südlichen Stängelbrenners (*Colletotrichum trifolii*). Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. 22, 131-132.

KÖLLIKER R, ENKERLI J, WIDMER F (2006): Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. Molecular Ecology Notes 6, 50-53.

MARUM P, SMITH RR, GRAU CR (1994): Development of procedures to identify red clover resistant to *Sclerotinia trifoliorum*. Euphytica 77, 257-261.

ÖHBERG H, RUTH P, BANG U (2005): Effect of Ploidy and Flowering Type of Red Clover Cultivars and of Isolate Origin on Severity of Clover Rot, *Sclerotinia trifoliorum*. J Phytopathology 153, 505-511.

ÖHBERG H, RUTH P, BANG U (2008): Differential responses of red clover cultivars to *Sclerotinia trifoliorum* under diverse natural climatic conditions. Plant Pathology 57, 459-466.

- PRATT RG (1992): Morphology and Host Specialization of *Sclerotinia trifoliorum* from Small Hop Clover. *Plant Dis* 76, 661-664.
- SCHUBIGER FX, BOLLER B, STRECKEISEN P (2003a): Resistenz von Rotklee gegen den südlichen Stängelbrenner (*Colletotrichum trifolii*). 44. Fachtagung des DLG-Ausschusses „Gräser, Klee und Zwischenfrüchte“, 2. und 3. Dezember 2003, Fulda.
- SCHUBIGER FX, STRECKEISEN P, BOLLER B (2003b): Resistance to southern anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) in cultivars of red clover (*Trifolium pratense*). *Czech J Genet Breed* 39 (Special Issue), 309-312.
- SCOTT SW (1984): Clover Rot. *The Botanical Review* 50, 491-504.
- SUTER D, BRINER HU, MOSIMANN E, BERTOSSA M (2002): Liste der empfohlenen Sorten von Futterpflanzen 2003-2004. *Agrarforschung* 9 (10), I-XVI.
- VESTAD R (1960): The effect of induced autotetraploidy on resistance to clover rot (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.) in red clover. *Euphytica* 9, 35-38.
- VLEUGELS T, BAERT J, VAN BOCKSTAELE E (2011): Construction of a bio-test for infection with *Sclerotinia trifoliorum* in red clover breeding programs. 29<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops & Amenity Grasses Section Meeting, Book of Abstracts.
- VLEUGELS T, BAERT J, DE RIEK J, HEUNGENS K, MALENGIER M, CNOPS G, VAN BOCKSTAELE E (2010): Diversity study on *Sclerotinia trifoliorum* Erikss., the causal agent of clover rot in red clover crops (*Trifolium pratense* L.). *Commun Agric Appl Biol Sci* 75, 649-653.
- YLI-MATTILA T, KALKO G, HANNUKALA A, PAAVANEN-HUHTALA S, HAKALA K (2010): Prevalence, species composition, genetic variation and pathogenicity of clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) and *Fusarium* spp. in red clover in Finland. *Eur J Plant Pathol* 126, 13-27.
- ZHANG F, CHEN S, CHEN F, FANG W, CHEN Y, LI F (2011): SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). *Mol Breeding* 27, 11-23.

## 6 Übersicht realisierter Veröffentlichungen

### Tagungsbeiträge

JACOB I, HARTMANN S, SCHUBIGER FX, STRUCK C (2010): Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. Grassland in a changing world, Book of Abstract, 61.

JACOB I, HARTMANN S, SCHUBIGER FX, STRUCK C (2010): Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany concerning the resistance to Southern Anthracnose. Grassland in a changing world, Grassland Science in Europe, Volume 15, 344-346.

JACOB I, HARTMANN S, SCHUBIGER FX, STRUCK C (2010): Resistenz der in Deutschland zugelassenen Rotkleearten gegen den Erreger des Südlichen Stängelbrenners (*Colletotrichum trifolii*). Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. 22, 131-132.

JACOB I (2010): Anthracnose bei Rotklee. 51. Fachtagung des DLG-Ausschusses „Gräser, Klee und Zwischenfrüchte“, 5. November 2010, Bonn, S. 33-35.

### Veröffentlichungen

JACOB I, HARTMANN S (2011): Rotklee in Gefahr, bioland, 07/2011, 10-11. (Richtigstellung: bioland 08/2011, 10).

### Teilnahmen an Arbeitskreisen

Krankheiten und Schädlinge im ökologischen Landbau, LfL, Freising

12.10.2009 Dr. S. Hartmann, I. Jacob

04.05.2010 Dr. S. Hartmann

03.05.2011 I. Jacob

24.07.2012 I. Jacob

Leguminosen- und Futterpflanzenzüchtung für den ökologischen Landbau

12.11.2009, LfL, Freising Dr. S. Hartmann, I. Jacob

30.07.2010, LLA Triesdorf Dr. S. Hartmann, I. Jacob

28.07.2011, LfL, Freising Dr. S. Hartmann

## Weitere Vorträge und Präsentationen

Datum	Veranstaltung, Ort	Titel des Vortrages
16.07.2009	Doktorandenseminar, Universität Rostock, AUF, Phytomedizin	Projektvorstellung: Sicherung und Verbesserung der Verfügbarkeit von ökologisch erzeugtem Rotkleeaatgut durch die Entwicklung von Selektionsverfahren gegenüber samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten zur Züchtung nachhaltig resistenter Sorten
15.-17.03.2010	GPZ-Haupttagung, Posterpräsentation	Genetic diversity of red clover varieties listed in Germany in view of resistance to <i>Colletotrichum trifolii</i>
03.11.2010	GFP Arbeitsgruppe Futterpflanzen, Bonn	Projektvorstellung: Sicherung und Verbesserung der Verfügbarkeit von ökologisch erzeugtem Rotkleeaatgut durch die Entwicklung von Selektionsverfahren gegenüber samen- und bodenbürtigen Pilzkrankheiten zur Züchtung nachhaltig resistenter Sorten
25.11.2010	Doktorandenseminar, Universität Rostock, AUF, Phytomedizin	Anthracoze bei Rotklee
17.01.2011	AgrosNet-Doktorandentag, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	Selektion und Entwicklung anthracoseresistenter Rotkleearten
29.11.2011	Agroscope, Molekulare Ökologie, CH-Zürich	Anthracoze bei Rotklee – Progress Report
27.03.2012	LfL-Kolloquium, Freising	Anthracoze bei Rotklee: Ansätze zur Züchtung resistenter Sorten
10.05.2012	Doktorandenseminar, Universität Rostock, AUF, Phytomedizin	Anthracoze bei Rotklee: Ansätze zur Züchtung resistenter Sorten
12.-13.09.2012	GPZ-Tagung "Brennpunkt Leguminosen: Ertrag und Qualität"	Züchterische Ansätze zur Verbesserung der Anthracose- Resistenz bei Rotklee
Geplant: 06.11.2012	53. Tagung des DLG- Ausschusses für Gräser, Klee und Zwischenfrüchte, Bonn	Ansätze zur Entwicklung anthracoseresistenter Rotkleearten
Geplant: 05.-08.03.2013	12. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Bonn, Vortrag/Posterpräsentation (Beitrag eingereicht)	Verbesserung der Resistenz von Rotklee gegen <i>Colletotrichum trifolii</i> durch rekurrente Selektion



## Anhang

Tab. A1: Erregersammlung.

Nr.	Lage	Höhenmeter [m über NN]	VF	Sorte	Datum	ökologisch	konventionell	Erreger
	N							
1	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
2	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
3	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
4	LKR Straubing-Bogen		WW	Lucrum	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
5	LKR Straubing-Bogen		WG	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
6	LKR Straubing-Bogen		WG	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
7	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
8	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	
9	LKR Straubing-Bogen		WW	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
10	LKR Straubing-Bogen		WR	Nemaro	08.04.2009	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
11	LKR Straubing-Bogen		WR	Nemaro	08.04.2009	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
12	LKR Straubing-Bogen		WT	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
13	LKR Straubing-Bogen		WT	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
14	LKR Straubing-Bogen		WT	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
15	LKR Straubing-Bogen		WT	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
16	LKR Straubing-Bogen		WT	Taifun	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
17	LKR Straubing-Bogen		WG	Lucrum	08.04.2009		x	
18	LKR Straubing-Bogen		WR	Lucrum	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
19	LKR Straubing-Bogen		SG	Titus	08.04.2009	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
20	LKR Straubing-Bogen		WW	Nemaro	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
21	LKR Straubing-Bogen		WW	Nemaro	08.04.2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
22	BSA Scharnhorst				April 2009		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
23	49°00.857' 11°59.160'		WR	Titus	21.07.2009	x		<i>Colletotrichum spec.</i>
24	49°10.055' 11°48.478'		H	Titus	21.07.2009	x		
25	49°08.630' 11°26.827'		SG	Titus	21.07.2009	x		
26	49°10.824' 11°33.828'		H	Titus	21.07.2009	x		
27	49°20.262' 11°39.460'		SG	Titus	21.07.2009	x		
28	49°20.634' 11°39.580'		WR	Titus	21.07.2009	x		
29	49°34.910' 010°29.173'	317	SG	Titus	23.07.2009	x		

Nr.	Lage	Höhenmeter [m über NN]	VF	Sorte	Datum	ökologisch	konventionell	Erreger
	N							
	E							
30	49°34.894' 010°29.638'	308	WR	Titus	23.07.2009	x		
31	49°34.355' 010°29.020'	354	H	Titus	23.07.2009	x		
32	49°34.424' 010°28.016'	344		Titus	23.07.2009	x		
33	49°34.424' 010°26.666'	336		Nemaro	23.07.2009	x		<i>Colletotrichum spec.</i>
34	49°34.639' 010°27.527'	336		Nemaro	23.07.2009	x		
35	49°34.607' 010°27.448'	341		Nemaro	23.07.2009	x		
36	49°34.830' 010°29.635'	326		Nemaro	23.07.2009	x		
37	48°56.022' 012°40.665'	327	WR	Nemaro	29.07.2009	x		
38	48°55.173' 012°38.992'	320	WR	Nemaro	29.07.2009	x		
39	48°55.173' 012°38.992'	320	WR	Nemaro	29.07.2009	x		
40	48°42.720' 012°18.695'		WR	Nemaro	29.07.2009	x		
41	48°42.720' 012°18.665'		WR	Nemaro	29.07.2009	x		
42	48°30.501' 012°09.019'	389	WR	Titus	29.07.2009	x		
43	48°28.405' 012°20.688'	467	WR	Titus	29.07.2009	x		
44	48°29.016' 012°20.616'	493	WR	Titus	29.07.2009	x		
45	48°38.800' 012°48.180'	403	H	Titus	29.07.2009	x		
46	48°55.470' 012°39.025'	321		div.	04.08.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>
47	48°56.866' 012°38.614'	335		div.	04.08.2009		x	<i>Colletotrichum trifolii</i>
48	ähnlich 24			div.	04.08.2009		x	
49	51°08.955' 13°20.097'		WG	Milvus	14.08.2009		x	
50	51°08.884' 13°21.870'		WG	Milvus	14.08.2009		x	
51	51°15.286' 13°14.103'		WW	Taifun	14.08.2009		x	
52	50°25.302' 012°03.811	405		Titus	18.08.2009	x		
53	50°25.302' 012°03.115'	401		Titus	18.08.2009	x		
54	50°36.610' 012°04.681'	440	SG	Nemaro	18.08.2009		x	<i>Colletotrichum spec.</i>
55	50°58.185' 012°17.094'	264	SG VVF WR	Tempus	18.08.2009	x		
56	50°47.492' 012°49.975'	379	WW VVF WRA	Taifun	19.08.2009		x	
57	51°03.021' 013°27.905'	282	WG	Taifun	19.08.2009		x	
58	50°45.125' 012°35.555'	365	SG	Mars	19.08.2009		x	
59	48°55.470' 012°39.025'	321		div.	26.08.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>

Nr.	Lage	Höhenmeter [m über NN]	VF	Sorte	Datum	ökologisch	konventionell	Erreger
	N							
	E							
60	48°55.470'	321		div.	26.08.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>
	012°39.025'							
61	48°55.470'	321		div.	26.08.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>
	012°39.025'							
62	48°55.470'	321		div.	26.08.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>
	012°39.025'							
63	48°55.470'	321		div.	26.08.2009	x		
	012°39.025'							
64	48°04.105'	572		div.	17.09.2009		x	<i>Colletotrichum spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i>
	011°55.080'							
65	48°23.964'	489	RKL-	div.	05.10.2009	x		<i>Colletotrichum trifolii</i>
	011°38.720'		Gras					
66	48°23.964'	489		div.	12.10.2009	x		<i>Colletotrichum spec.</i>
	011°38.720'							
67	48°11.379'	496		div.	14.10.2009	x		<i>Colletotrichum destructivum</i>
	011°12.875'							
68	48°23.964'	489		div.	22.10.2009	x		
	011°38.720'							
69	Hilgertshausen			Titus	30.03.2010	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
70	48°22.165'			div.			x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
	011°42.932'							
71	Hilgertshausen			Titus	08.04.2010	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
72	48°55.470'	325		div.	13.04.2010	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
	012°39.024'							
73	48°23.964'			div.	15.04.2010	x		<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
	011°38.720'							
74	Versuchsstation Steinach			div.	21.04.2010		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
75	48°56.866'			div.	21.04.2010		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
	012°38.614'							
76	48°56.866'			div.	21.04.2010		x	
	012°38.614'							
77	Am Labor Freising			div.	29.04.2010		x	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
78	48°22.165'			WKL	29.04.2010		x	
	011°42.932'							
79	Versuch Hohenkammer			LUZ	29.04.2010	x		<i>Leptosphaerulina trifolii</i>
80	48°55.470'	325		div.	29.04.2010	x		<i>Fusarium spec.</i> , <i>Phoma spec.</i>
	012°39.024'							
81	49°35.161'	346		Titus	26.07.2010	x		<i>C. destructivum</i>
	010°30.237'							
82	49°35.145'	370		Nemaro	26.07.2010	x		<i>Phoma spec.</i>
	010°26.950'							

Nr.	Lage	Höhenmeter [m über NN]	VF	Sorte	Datum	ökologisch	konventionell	Erreger
	N							
	E							
83	49°35.142'	373		Nemaro	26.07.2010	x		
	010°26.950'							
84	49°35.142'	373		Titus	26.07.2010	x		
	010°26.950'							
85	49°34.910'	360		Titus	26.07.2010	x		<i>Fusarium spec.</i>
	010°29.622'							
86	49°34.978'	346		Titus	26.07.2010	x		
	010°29.511'							
87	50°15.381'	520		Merviot	27.07.2010		x	<i>Phoma spec.</i> , <i>Fusarium spec.</i> , <i>Leptosphaerulina trifolii</i>
	006°56.986							
88	50°15.580'	500		Merviot	27.07.2010		x	
	006°57.331							
89	50°15.75'	509		Merviot	27.07.2010		x	
	006°57.332'							
90	50°15.839'	513		Merviot	27.07.2010		x	
	006°57.374'							
91	50°12.217'	448		Merviot	27.07.2010		x	<i>Fusarium spec.</i>
	006°56.731'							
92	50°12.959'	389		Merviot	27.07.2010	x		
	007°11.470'							
93	49°50.124'	401		Merviot	27.07.2010	x		<i>Phoma spec.</i>
	007°22.798'							
94	49°36.627'	395		LUZ Plato	27.07.2010	x		
	007°39.695'							
95	49°35.879'	296		LUZ Plato	27.07.2010	x		
	008°06.433'							
96	49°29.567'	258		Oden- wälder V	28.07.2010	x		
	009°39.297'							
97	49°29.549'	265		Oden- wälder V	28.07.2010	x		
	009°39.197'							
98	49°29.718'	292		Oden- wälder V	28.07.2010	x		
	009°39.505'							
99	49°29.648'	276		Oden- wälder V	28.07.2010	x		<i>Phoma spec.</i>
	009°39.699'							
100	49°39.919'	282		Oden- wälder V	28.07.2010	x		<i>Phoma spec.</i>
	009°39.179'							
101	49°29.098'	330		Oden- wälder V	28.07.2010	x		
	009°40.993'							
102	49°30.0352'	284		Oden- wälder V	28.07.2010	x		
	009°38.227'							
103	Landshut Schönbrunn, Wolfsteiner Au				29.07.2010	x		
104	Dietldorf (bei Regensburg)				29.07.2010	x		
105	48°23.958'	499		div.	02.08.2010	x		
	011°38.740'							
106	47°56.785'	597		div.	04.08.2010		x	<i>Fusarium spec.</i> , <i>C. destructivum</i> , <i>C. trifolii</i>
	009°37.229'							

Nr.	Lage	Höhenmeter [m über NN]	VF	Sorte	Datum	ökologisch	konventionell	Erreger
	N							
	E							
107	47°56.366' 009°37.657'	604		div.	04.08.2010		x	<i>Fusarium spec.</i> , <i>C. trifolii</i>
108	47°57.526' 009°38.534'	568		div.	04.08.2010		x	
109	48°22.165' 011°42.932'	460		div.	04.08.2010		x	<i>C. destructivum</i>
110	48°22.165' 011°42.932'	460		div.	04.08.2010		x	
111	48°22.165' 011°42.932'	460		div.	04.08.2010		x	<i>Fusarium spec.</i>
112	48°21.948' 011°42.863'	460		div.	04.08.2010		x	<i>Fusarium spec.</i> , <i>C. destructivum</i> , <i>C. trifolii</i>
113	48°55.470' 012°39.024'	325		div.	16.08.2010	x		<i>Fusarium spec.</i>
114	48°11.379' 011°12.875'	496		div.			x	
115	48°11.379' 011°12.875'	496		div.			x	<i>Fusarium spec.</i>
116	50°49.790' 009°40.800'	225		div.	26.08.2010		x	<i>C. trifolii</i>
117	48°55.470' 012°39.024'	325		div.	07.09.2010	x		
118	48°55.470' 012°39.024'	325		div.	08.09.2010	x		
119	48°23.958' 011°38.740'	499		div.	14.09.2010	x		<i>C. trifolii</i> , <i>Fusarium spec.</i>
120	48°35.536' 012°15.543'	375		RKL, LUZ, WSC	16.09.2010	x		
121	48°33.952' 012°22.631	481		div.	16.09.2010	x		
122	48°37.276' 012°10.303'	463		WKL, RKL, LUZ	16.09.2010	x		
123	48°55.470' 012°39.024'	325		Titus	07.10.2010	x		<i>C. trifolii</i>
124	Thermalbad Wiesenbad				17.10.2010		x	
125	Landwirtschaftszentrum Eichhof, Hessen			div.	09.08.2011		x	<i>C. destructivum</i>
126	CH-Zürich			div.	16.08.2011		x	<i>C. trifolii</i>
127	Viehhausen			div.	19.08.2011	x		<i>C. destructivum</i>
128	Pulling				13.09.2011	x		<i>C. destructivum</i>
129	Pilsach, Neumarkt i.d.Obpf.				14.09.2011	x		<i>C. destructivum</i>
130	Chieming				18.10.2011	x		<i>C. destructivum</i>
131	Landwirtschaftszentrum Eichhof, Hessen				20.10.2011		x	