

Ute Menge-Hartmann, Walid Soufan, Jörg-Michael Greef

## Einfluss von Pflanzenentwicklungsstadium und N-Düngung auf Gehalte wasserlöslicher Kohlenhydrate und von Fruktanen bei unterschiedlichen Sorten von *Lolium perenne*

The Influence of Plant Development Stage and N Fertilization on the Content of Water-Soluble Carbohydrates and Fructans in Different Varieties of *Lolium perenne*

365

### Zusammenfassung

Für eine effiziente Ernährung von Wiederkäuern ist die gleichzeitige Verfügbarkeit von Stickstoff und von metabolischer Energie aus schnell fermentierbaren wasserlöslichen Kohlenhydraten (WK) von Bedeutung. Zum Auffinden höherer WK-Gehalte von Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*) sollten daher die WK-Niveaus im Laufe der Pflanzenentwicklung und unter dem Einfluss von diurnalem Rhythmus und N-Düngungsintensität untersucht werden. Hierzu wurden in einem zweijährigen Versuch fünf Sorten unter zwei N-Düngungsstufen während des ersten Aufwuchses zu vier (2006) bzw. elf Terminen (2007) beerntet. Die WK- und Fruktan-Gehalte wurden mittels HPLC und der Polymerisationsgrad (DP) der Fruktane mit Anionenaustausch-HPLC mit gepulster amperometrischer Detektion analysiert.

Die Sorten erreichten durchschnittliche WK- und Fruktan-Gehalte von 22,4 bzw. 13,6 % i. d. TM, die höchsten Gehalte erzielte die Hochzuckergras(HZG)-Sorte Aberavon. Im Laufe der Pflanzenentwicklung traten die höchsten WK- und Fruktangehalte zu Beginn des Ährenschiebens auf, wobei sie in den Stängeln höher waren als in den Blättern. Im Gegensatz zur Tageszeit übte die Höhe der N-Düngung einen signifikanten Einfluss auf die WK-Gehalte aus; die Niedrig-Düngung führte gegenüber der Normal-Düngung zu einem um 26,1 % höheren WK- und einem um 41,2 % höheren Fruktan-Gehalt. Mit fortschreitender Pflanzenentwicklung nahmen die relativen Anteile an Fruktanen mit niedrigem Polymerisationsgrad (DP) ab und diejenigen mit höherem DP zu. Die HZG-Sorte Aberavon zeichnete sich außerdem durch einen höheren Anteil

kurzkettiger und einen geringeren Anteil langkettiger Fruktan-Polymere aus. Durch eine Kombination von Sortenwahl, optimalem Pflanzen-Entwicklungsstadium und maßvoller N-Düngung kann der Energiegehalt und die Verdaulichkeit von Grünfütter offensichtlich positiv beeinflusst werden.

**Stichwörter:** Deutsches Weidelgras, *Lolium perenne*, Hochzuckergras(HZG)-Sorte, N-Düngung, wasserlösliche Kohlenhydrate (WK), Fruktane, Polymerisationsgrad (DP), Anionenaustausch-HPLC mit gepulster amperometrischer Detektion

### Abstract

Efficient ruminant nutrition requires the simultaneous availability of nitrogen and metabolic energy from quickly fermenting water-soluble carbohydrates (WSC). To find higher WSC contents in perennial rye grass (*Lolium perenne*), the WSC level in the course of plant development and under the influence of diurnal rhythm and N fertilization intensity was studied. For this purpose, five varieties were analysed for two years under two N fertilization steps and harvested on four (2006) or rather eleven dates (2007) during the first growth period. The WSC and fructan content were analysed with HPLC and the polymerisation level of fructans with anionic exchange HPLC with pulsed amperometric detection.

The varieties achieved an average WSC and fructan content of 22.4% and 13.6% respectively of the dry matter. The highest levels were reached with the High Sugar

### Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

### Kontaktanschrift

Dr. Ute Menge-Hartmann, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, E-Mail: ute.menge-hartmann@jki.bund.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

April 2009

Grass (HSG) variety Aberavon. In the course of plant development, the highest WSC and fructan contents were observed at the beginning of ear emergence, with higher contents in the stalks than in the leaves. In contrast to the time of day, the level of nitrogen fertilizer had a significant impact on WSC content, the lower fertilization led to a 26.1% higher WSC and a 41.2% higher fructan content compared to the control. With increasing plant development, the relative portion of fructans with low polymerization level (DP) dropped, while that with higher DP increased. The HSG variety Aberavon was also marked by a higher portion of short chain and a lower portion of long chain fructan polymers. The energy content and the digestibility of perennial ryegrass can apparently be influenced positively by a combination of choice of variety, optimal plant development stage and moderate N fertilization.

**Key words:** Perennial ryegrass, *Lolium perenne*, high sugar grass (HSG) variety, N fertilization, water soluble carbohydrates (WSC), fructans, polymerization level (DP), anionic exchange HPLC with pulsed amperometric detection

## Einleitung

In der Landwirtschaft der gemäßigten Klimazonen sind perennierende Gräser für die Bereitstellung von Grundfutter für Wiederkäuer dominant. Bei der Erzeugung von Milch wird der Futterbedarf zu 80% und bei der Rind- und Kalbfleischproduktion zu 70% durch Futtergras abgedeckt (WILKINS und HUMPHREYS, 2003). Einen grundlegenden Bestandteil der Futtergräser bilden Kohlenhydrate in Form freier Zucker oder als Polysaccharide. Sie stellen metabolische Energie bereit und sind eine Quelle für Kohlenstoffskelette und vielfältige Biosynthesen (HUMPHREYS et al., 2006). Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist Protein, dessen Abbau im Pansen der Wiederkäuer von Mikroorganismen übernommen wird. Steht jedoch zu wenig schnell fermentierbare Energie bereit, so wird zu wenig Grasprotein in Mikrobenprotein konvertiert, das seinerseits die wesentliche Proteinquelle der Tiere für Wachstum und Laktation darstellt. Eine Verbesserung der Synchronisierung von Kohlenhydrat- und N-Versorgung maximiert die N-Konversion zu Milch und Fleisch bei gleichzeitiger Reduktion von N-Ausscheidungen und den damit verbundenen Umweltbelastungen (MILLER et al., 1999; MILLER et al., 2001).

Das Deutsche Weidelgras (*Lolium perenne*) ist das wichtigste Futtergras in der europäischen Landwirtschaft (TURNER et al., 2002). Bereits in den 80er Jahren wurde eine breite genetische Variation in der Konzentration seiner Kohlenhydrate beobachtet (HUMPHREYS, 1989a, b). Mit Hilfe konventioneller Pflanzenzüchtung konnten im Institute of Grassland and Environmental Research (IGER) in Großbritannien erfolgreich leistungsfähige Sorten von Deutschem Weidelgras mit einer höheren Konzentration an wasserlöslichen Kohlenhydraten

(WIK), sogenannte Hochzuckergras(HZG)-Sorten, entwickelt werden.

Mit Glucose, Fructose und Saccharose zusammen bilden die Polyfruktosane (Fructosane oder Fruktane) die Hauptzuckerformen des Zellinhaltes der wichtigsten Gräser des gemäßigten Klimabereichs (KÜHBAUCH, 1978, HENDRY, 1993). Fruktane (Polyfructosyl-Saccharosen) sind Polymere aus Fructoseeinheiten mit Polymerisationsgraden (DP) von 3 bis etwa 200 mit terminalem Glucoseresest (HENDRY, 1993; GUERRAND et al., 1999; PAVIS et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte einerseits untersucht werden, wie sich während des ersten Aufwuchses bei Sorten unterschiedlicher Reifegruppen und Kohlenhydratniveaus von *Lolium perenne* die Konzentration wasserlöslicher Kohlenhydrate im Laufe der Pflanzenentwicklung und im diurnalen Rhythmus verändert und welchen Einfluss die Höhe der N-Düngung auf den Kohlenhydratgehalt der Sorten ausüben kann. Die Analysen könnten dazu beitragen, durch eine Kombination von Optimierungsparametern wie Sortenwahl, Pflanzenentwicklungsstadium und Umweltfaktoren wie N-Düngung einen positiven Einfluss auf Gehalt, Verfügbarkeit und Gleichmäßigkeit von Kohlenhydraten in Grünfutter auszuüben. Darüber hinaus wurde mit dem Polymerisationsmuster der Fruktan-Komponente der wasserlöslichen Kohlenhydrate ein Qualitätsaspekt untersucht, der möglicherweise Bedeutung für die Verdaulichkeit haben könnte.

Für die Quantifizierung der WIK wurde eine HPLC-Methode angewendet, bei der die Gesamtkonzentration aus der Summe der Einzelzucker- und Fruktanbestimmungen ermittelt wurde. Die Fruktan-Polymere wurden mittels Anionenaustausch-HPLC mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) qualitativ analysiert.

## Material und Methoden

### Sorten, Versuchsanlage und Behandlungen

Im Rahmen eines Sortenversuchs mit 20 di- bzw. tetraploiden Sorten verschiedener Futtergräser aus den Reifegruppen früh, mittel und spät (SOUFAN, 2008) wurden fünf diploide Sorten des Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne*) für einen zweijährigen Zeitreihenversuch (2006 bis 2007) ausgewählt. Die Auswahl der Sorten erfolgte nach Zugehörigkeit der Sorten zu verschiedenen Reifegruppen, verbunden mit unterschiedlich hohen WIK-Gehalten in den Pflanzen (Tab. 1). Die Sorten wurden im Anlagejahr 2005 am 22.09. in Reinsaat mit einer Saatstärke von 25 kg ha<sup>-1</sup> mit einer Parzellendrillmaschine (Firma Wintersteiger, Ried, Österreich) auf dem Versuchsfeld (Bodentyp lehmiger Sand) des Instituts für Pflanzenbau und Bodenkunde des Julius Kühn-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen in Braunschweig-Völkenrode, ausgesät. Die Stickstoffdüngung mit Kalkammonsalpeter (KAS) erfolgte im ersten Versuchsjahr 2006, jeweils in einfacher Wiederholung, in der Variante Normaldüngung mit Raten von 80 kg ha<sup>-1</sup> N

**Tab. 1. Sorte, Züchter, Reifegruppe und erwarteter Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WK) von Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*)**

Sorte	Züchter	Reifegruppe (Ährenschieben; Tage nach dem 1. April)***	WK-Gehalt
Licarta	EURO GRASS Breeding (EGB), Asendorf	früh	niedrig**
EGB1	EGB	früh	hoch**
Respect	Innoseeds B.V., NL	mittel (51)***	niedrig**
Rodrigo	EGB	Mittel (54)***	hoch**
Aberavon	(IGER)Saatzucht Steinach GmbH	Spät (59)***	hoch*

\* Sorte lässt einen höheren Gehalt an wasserlöslichen Kohlenhydraten und eine höhere Verdaulichkeit als vergleichbare diploide Sorten erwarten; Quelle Bundessortenamt, Beschreibende Sortenliste 2007: Futtergräser, Esparsette, Klee, Luzerne

\*\* Quelle: Einschätzung nach EURO GRASS

\*\*\* Budessortenamt, Beschreibende Sortenliste 2007: Futtergräser, Esparsette, Klee, Luzerne

zum 1. Schnitt und je 60 kg ha<sup>-1</sup> zum 2. und 3. Schnitt und in der Variante Niedrigdüngung mit Raten von 30 kg ha<sup>-1</sup> zum 1. Schnitt und je 10 kg ha<sup>-1</sup> zum 2. und 3. Schnitt. Im zweiten Versuchsjahr 2007 wurde nur die Variante Normaldüngung ausgeführt. Zur Grunddüngung wurden im Anlagejahr am 09.02.2005 750 kg ha<sup>-1</sup> Thomaskali (P:K:Mg im Verhältnis von 7:21:3) ausgebracht, im ersten Versuchsjahr am 25.01.2006 400 kg ha<sup>-1</sup> Kornkali (K:Mg im Verhältnis von 40:6) und im zweiten Versuchsjahr am 08.03.07 1000 kg ha<sup>-1</sup> Thomaskali.

Aufgrund von starker Trockenheit wurde im ersten Versuchsjahr mit 15 mm (20.07.06) und im zweiten Versuchsjahr mit 40 mm (02.05.07) eine Erhaltungsberegnung durchgeführt.

Die Parzellengröße betrug 46,2 m<sup>2</sup> (33,0 \* 1,4 m). Die Parzellenzwischenräume wurden im Frühjahr und Herbst mit Roundup® (Monsanto) gespritzt.

#### Beerntung

Im Jahr 2006 wurde während des ersten Aufwuchses in wöchentlichem Abstand bis zum Ende der Blüte an insgesamt 4 Erntetagen jeweils um 8:00 Uhr und um 13:00 Uhr geerntet. Die erste Beerntung erfolgte am 03.05.06 drei Wochen nach Vegetationsbeginn (13.04.06), die letzte am 24.07.06. Der Tag der Ernte richtete sich nach den Wetterverhältnissen, da die Ernten stets bei sonniger Witterung erfolgen sollten, um einstrahlungsbedingte Veränderungen im WK-Gehalt während der Probenentnahmeperiode zu minimieren. Im Versuchsjahr 2007 erfolgte die Beerntung während des ersten Aufwuchses vom 12.04.07 über das Ende der Blüte hinaus bis zum 30.05.07 zu elf Terminen im Abstand von minimal 3 bis zu maximal 8 Tagen jeweils etwa um 11:00 Uhr. Vegetationsbeginn des Versuchsjahres 2007 war am 01.03.07, wegen ungünstiger Witterung (s. o.) fand die erste Beerntung jedoch erst 6 Wochen nach Vegetationsbeginn statt.

Die nachfolgenden Aufwüchse wurden in beiden Jahren nicht beerntet, sondern es wurden lediglich Pflegeschnitte durchgeführt.

Bei jeder Ernte wurden die phänologischen Stadien (BBCH-Skalen aus: HACK et al., 1992) bestimmt. Die Pflanzenproben wurden bei jeder Ernte aus einem neuen Stück der Parzellen entnommen und hierbei auf eine Schnitthöhe von ca. 5 cm geschnitten. Ein Teil der umgehend kühl gelagerten Proben wurde für die Ganzpflanzenanalyse verwendet, der andere Teil in Blatt, Stängel und, in späteren Stadien, in Ähren separiert, die einzelnen Fraktionen gefriergetrocknet und anschließend auf 1 mm Siebdurchgang vermahlen.

#### Extraktion und Analyse gesamt-wasserlöslicher Kohlenhydrate (WK) und von Fruktan

Zur Extraktion der Kohlenhydrate wurde zunächst 1,0 g gefriergetrocknete, vermahlene Probe in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit 70 ml voll entsalztem Wasser für 30 Min. bei 80°C im Schüttelwasserbad extrahiert. Nach Abkühlen der Kolben auf 20°C wurde mit Wasser aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. In einem 20 µl-Aliquot des Filtrats wurden die individuellen löslichen Zucker quantitativ mit einem HPLC (Typ Kontron Instruments) mit einer Trennsäule Rezex RPM Monosaccharide (Phenomenex Ltd., Torrance, USA) bei 80°C mit vollentsalztem Wasser als Eluent (0,7 ml/Min.) analysiert. Die Zuckerkonzentrationen wurden mit einem Detektor Shodex RI-71 (Showa Denko K.K., Tokio, Japan) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe externer Standards, wobei für einen 2 bzw. 10%igen Standard je 20 bzw. 100 mg Fruktan (Raftiline® Beneo™ HP, Speicherkohlenhydrat aus der Zichorie, ORAFTI Active Food Ingredients, Tienen, Belgien), Saccharose, Glucose und Fructose (Fluka, Buchs, Schweiz) in 100 ml voll entsalztem Wasser gelöst wurden.

Die Polymere des Fruktans wurden in Anlehnung an eine Methode von PAVIS et al. (2001) mittels Anionenaustausch-HPLC und gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) qualitativ analysiert. Hierzu wurden die Fruktane aus 0,5 g der gefriergetrockneten und auf 1 mm gemahlene Proben auf dieselbe Weise extrahiert wie zur WK-Analyse und anschließend Aliquots der Extrakte

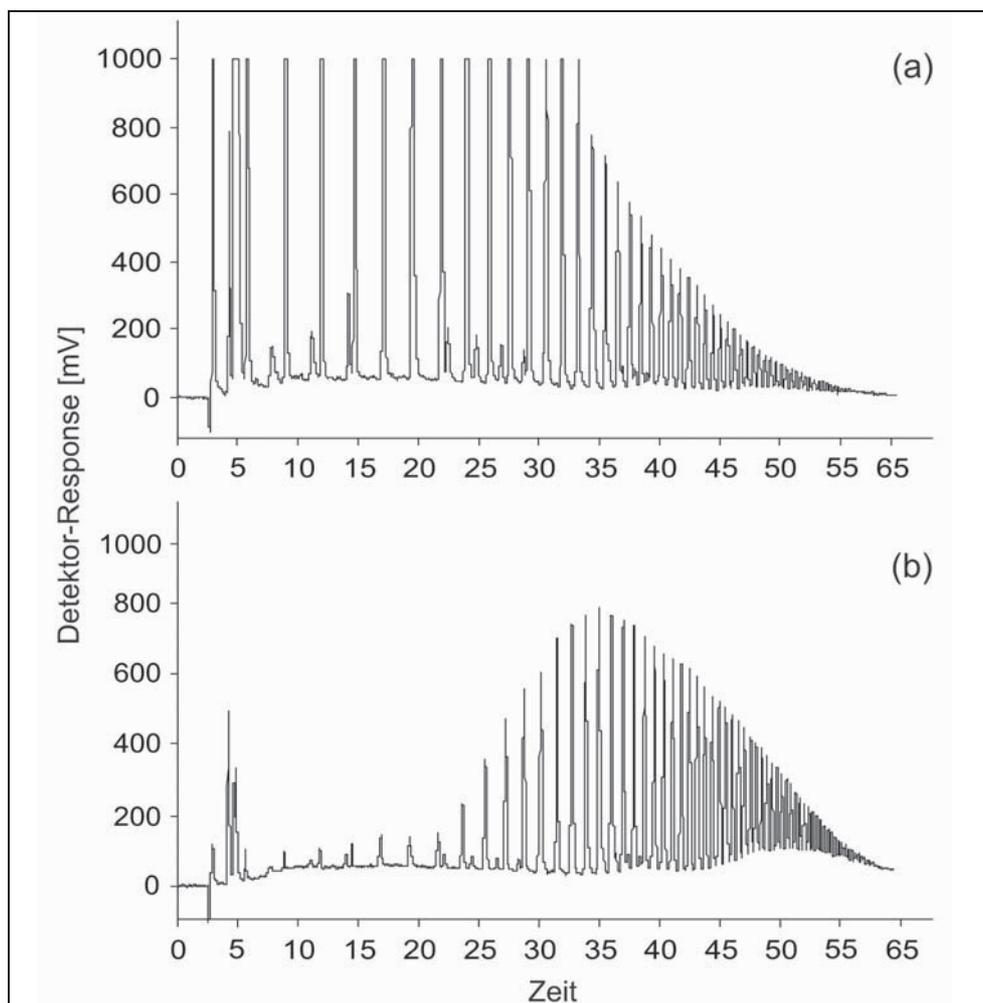
durch einen Nylon Spitzenfilter (0,45  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser) filtriert. Die Trennung erfolgte auf einer analytischen Trennsäule Carbo Pac PA-100 (4 x 250 mm) mit einer Vorsäule Carbo Pac PA-100 (4 x 50 mm) (Fa. Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA), bei 25°C mit einem Natriumacetat-Gradienten (0,5 ml/Min.) in NaOH, Eluent A: 0,1 mol/L NaOH, Eluent B: 450 mmol/L Natriumacetat. Der Gradient verlief nach folgenden Abstufungen: 0 Min. 89 % A und 11 % B, 60 Min. 0 % A und 100 % B, 65 Min. 100 % A und 0 % B, 67 Min. 100 % A und 0 % B.

Zur Detektion wurde ein gepulster amperometrischer Detektor (PAD, BioQuant PAM 2-MU Elektrochemischer Detektor mit Gold-Elektrode, Meßbereich 0,5  $\mu\text{A}$ ) eingesetzt mit PAD-Potentialen für E1 (400 ms), E2 (200 ms) und E3 (200 ms) von + 0,15 V, + 0,75 V bzw. - 0,80 V.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe von Zichorien-Inulin, dessen Polymerisationsgrad (DP) zwischen 2 und 60 liegt, und zwar mit den beiden Standardinulinen Raftiline® A. Niederpolymer, Beneo™ GR, mit einem mittleren DP von  $\geq 10$  und B. Hochpolymer, Beneo™ HP, bei dem der mittlere DP bei  $\geq 23$  liegt und die kleineren Moleküle entfernt wurden. Das Chromatogramm von Raftiline® GR zeigt bei kurzen Retentionszeiten einen hohen Anteil an kurzkettigen Fructooligosacchariden (Abb. 1a), während

dasjenige von Raftiline® HP in diesem Bereich nur einen sehr geringen Anteil hiervon aufweist (Abb. 1b). Erst mit zunehmender Retentionszeit wird die Konzentration an Fructooligosacchariden (GF (n)) größer, wobei der Anteil an höhermolekularen Fruktanen wächst (Abb. 1b). Für die Auswertung wurden alle Retentionszeiten und Peakflächen tabellarisch erfasst und die Retentionszeiten den Peaks laut Chromatogramm zugeordnet, beginnend mit dem ersten Peak bei etwa 9,5 Min. von Beneo™ GR als Peak GF 3. Zur Berechnung der prozentualen Verteilung der GF (n) wurden die gesamten Peakflächen eines Chromatogramms aufsummiert und sechs Gruppen zugeordnet, wobei in der ersten Gruppe kurzkettige Polymere mit Peaknummern von 3 bis 12 zusammengefasst wurden, gefolgt von einer Gruppe mittelkettiger Polymere mit 13 bis 22, während die folgenden Gruppen langkettige Polymere enthielten bis zur sechsten Gruppe mit Peaknummern  $> 52$ .

Die prozentuale Verteilung der Peakflächen der Inuline HP und GR diente bei der Auswertung und Ergebnisbetrachtung der Klärung von Veränderungen bzw. des Abbaus einzelner Fructooligosaccharide. Eine Konzentrationsbestimmung der einzelnen aufgetrennten Fructooligosaccharide war wegen nicht verfügbarer Standardsubstanzen nicht möglich.



**Abb. 1.** Chromatogramme der Standardinuline Raftiline® (a) Niederpolymer, Beneo™ GR mit einem mittleren Polymerisationsgrad (DP) der Inulinketten von  $\geq 10$ , und (b) Hochpolymer, Beneo™ HP, mit mittlerem DP von  $\geq 23$ .

**Tab. 2.** Durchschnittliche Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WIK) und an Fruktan aller fünf Weidelgrassorten im Verlauf des ersten Aufwuchses der Jahre 2006 und 2007

Versuchsjahr	WIK (% i. d. TM)	N	SD	Fruktan (% i. d. TM)	N	SD
2006	24,4 a	20	5,10	15,9 a	20	5,28
2007	25,3 a	20	2,36	16,3 a	20	2,76

Signifikante Unterschiede gelten für Werte in derselben Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben bei  $P < 0,05$ , SD = Standardabweichung

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm „Statistical Analysis Systems“ Version 9.1.2 (SAS, 2004). Die Daten wurden vor der Verrechnung auf Normalverteilung geprüft. In den Ergebnisdarstellungen sind signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  dargestellt. In der Ergebnisdarstellung werden die Signifikanzen in Form von Buchstaben angegeben, Werte mit gleichen Buchstaben unterschieden sich nicht signifikant.

Für die Varianzanalyse wurde die GLM Prozedur benutzt, um die Vergleiche innerhalb der Varianten durchzuführen.

Die Vergleiche (Versuchsjahr-, Schnittzeitpunkt-, Tageszeiten- und N-Düngungsstufenvergleich) wurden mit Paired-Samples T-Test durchgeführt.

### Ergebnisse

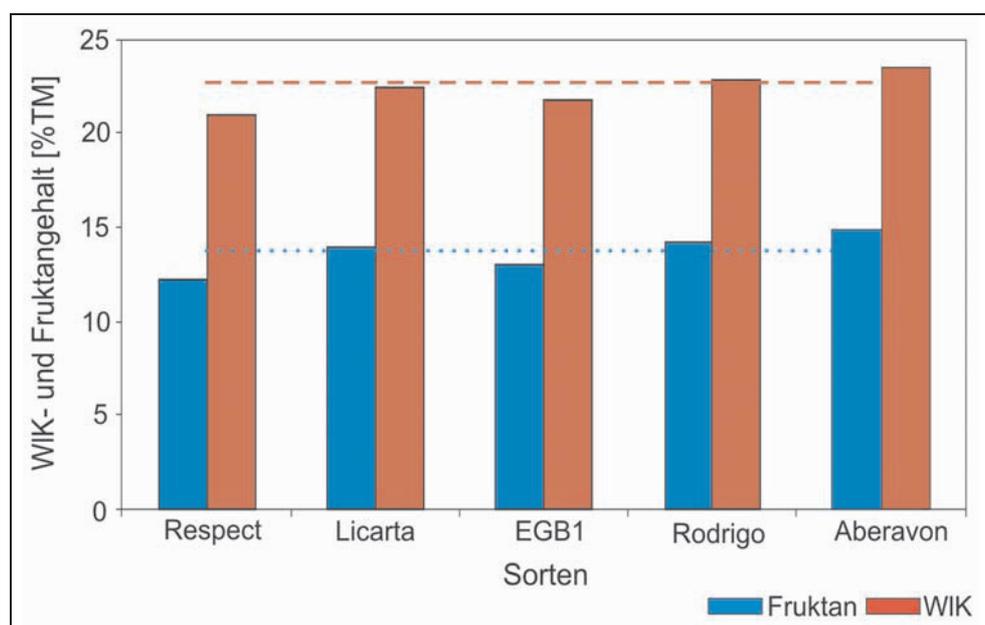
#### Wasserlösliche Kohlenhydrate und Fruktangehalte im Verlauf des ersten Aufwuchses

Die Gehalte der wasserlöslichen Kohlenhydrate und von Fruktan aller fünf Weidelgrassorten unterschieden sich

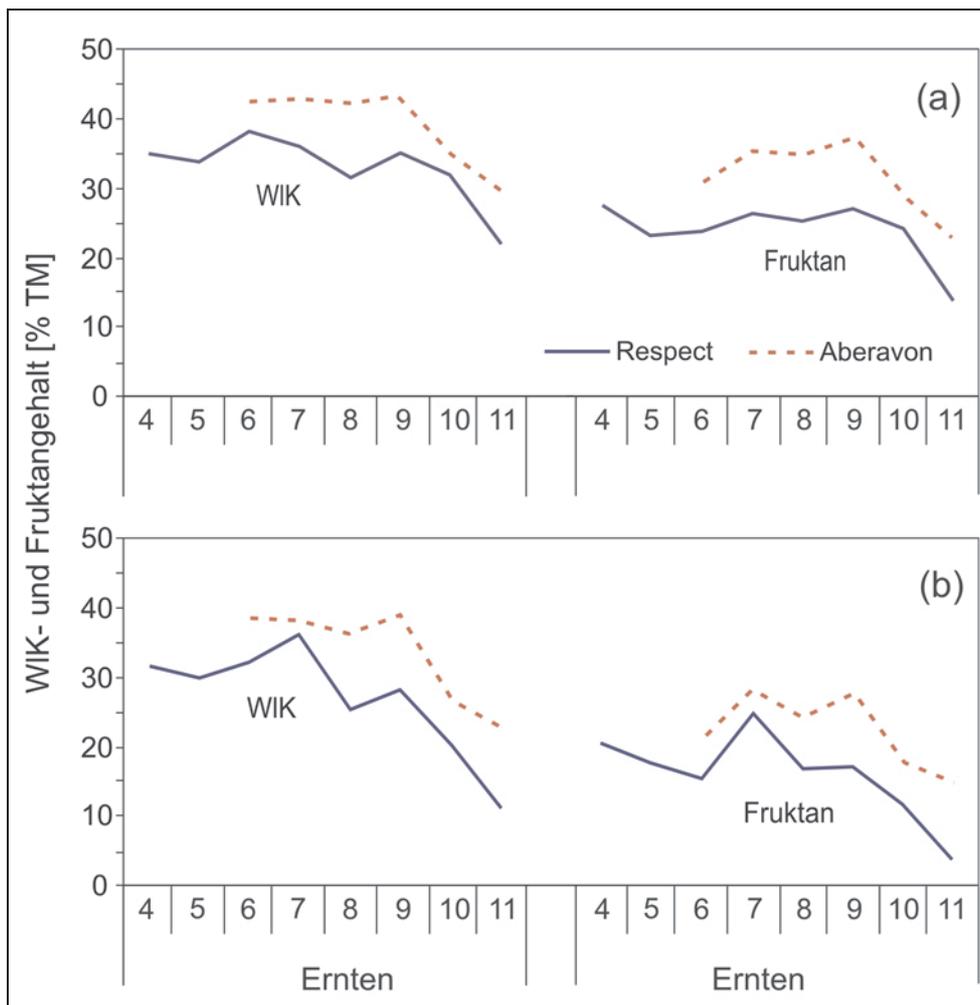
in den beiden Versuchsjahren nicht signifikant (Tab. 2). Im Mittel beider Versuchsjahre und aller Ernten erreichten die Sorten in den Ganzpflanzenproben einen durchschnittlichen Gehalt an WIK von 22,4 % und an Fruktan von 13,6 % (Abb. 2), die höchsten Gehalte aller fünf Sorten wies die Sorte Aberavon auf, die niedrigsten die Sorte Respect.

Die Veränderung des Gesamt-WIK-Gehalts der fünf Sorten während des ersten Aufwuchses zeigte einen in der Tendenz ähnlichen Verlauf. Während der Pflanzenentwicklung nahmen die WIK- und Fruktan-Gehalte unterschiedliche Niveaus an, wie die exemplarische Darstellung der Gehalte in Blättern und Stängeln der beiden Sorten Respect und Aberavon mit niedrigem bzw. höherem Kohlenhydratniveau zeigten (Abb. 3a, b, nur zweites Versuchsjahr). Die Gehalte der anderen drei untersuchten Sorten rangierten zwischen diesen beiden Sorten.

Generell stiegen die WIK- und die Fruktangehalte sortenspezifisch von der ersten bis zur siebten bzw. neunten Ernte an, der Phase kurz vor dem Ährenschieben (BBCH 51), danach fielen sie bis zum Ende des Aufwuchses, insbesondere in den Blättern der Sorte Respect, erheblich unter ihr Ausgangsniveau zurück (Abb. 3b).



**Abb. 2.** Durchschnittliche Fruktan- und WIK-Gehalte von Deutschem Weidelgras (*Lolium perenne*) im Mittel der Jahre und Ernten nach Sorten getrennt, sowie im Sortenmittel; .....Mittelwert Fruktan, ---- Mittelwert WIK.



**Abb. 3.** Gehalte an WIK und an Fruktan (a) in Stängeln und (b) in Blättern der Sorten Respect und Aberavon im Verlauf des ersten Aufwuchses des Jahres 2007.

Die Stängel akkumulierten bei der HZG-Sorte Aberavon WIK bis zu einem Gehalt von etwa 43% (Abb. 3a) und die Blätter maximal bis zu etwa 30% (Abb. 3b). Entsprechendes galt für die Fruktane mit einem Gehalt von maximal 37% in den Stängeln (Abb. 3a) und maximal etwa 21% in den Blättern (Abb. 3b). Die separate Analyse der Stängel- und der Blattfraktionen führte zu einer stärkeren Differenzierung zwischen den Sorten als die der Ganzpflanzen (nicht dargestellt).

Die Gehalte an WIK und an Fruktan nahmen in den Pflanzenorganen in der Reihenfolge Stängel, Blätter und Ähren ab (Abb. 4). Am Beispiel der 10. und 11. Ernte des zweiten Versuchsjahres, werden die prozentualen Anteile, die die Fruktane an den Gesamt-WIK einnahmen, dargestellt. Der prozentuale Anteil der Fruktanfraktion an den Gesamt-WIK dominierte in der Mehrzahl der untersuchten Proben gegenüber den anderen Kohlenhydraten. Er war in den Stängeln mit 75% am höchsten, und damit höher als in den Blättern und in diesen wiederum höher als in den Ähren (Abb. 4).

Ein Tageszeiteinfluss auf WIK- und Fruktangehalt war nicht zu beobachten bzw. war nur geringfügig. Der Gehalt der WIK wies im Mittel der Sorten, der Ernten und der N-Düngungsstufen im Verlauf des ersten Aufwuchses des ersten Versuchsjahres keine signifikanten Unterschie-

de zwischen einer Beerntung um 8 bzw. um 13 Uhr auf, lediglich der Fruktangehalt war bei einer Ernte um 8 Uhr um 1,6 % höher als um 13 Uhr (Tab. 3).

Einen stärkeren Einfluss als die hier untersuchten Tageszeiten übte die Höhe der N-Düngung auf den Gehalt der Kohlenhydrate in den Ganzpflanzen aus. So führte die Normal-Düngung im Mittel der Sorten und der Ernten zu einem um 26,1 % niedrigeren WIK- und einem um 41,2 % niedrigeren Fruktan-Gehalt als die Niedrig-Düngung (Tab. 4).

#### *Polymerisationsgrad von Fruktanen*

Die HPAEC-PAD-Analyse der Fruktan-Fractionen der WIK der fünf Weidelgrassorten ergab sowohl sortenspezifische Unterschiede der Fruktan-Profile als auch Veränderungen in den relativen Anteilen an Fruktanen unterschiedlichen Polymerisationsgrades (DP) im Laufe der Pflanzenentwicklung. Exemplarisch dargestellt werden die Ergebnisse der Sorte Respect mit niedrigem und der Hoch-Zucker-Sorte Aberavon mit höherem WIK- und Fruktan-Gehalt (vgl. Abb. 4, Abb. 5 und 6). Generell ließ sich hinsichtlich des Polymerisationsgrades eine Dynamik dahingehend feststellen, dass mit zunehmender Pflanzenentwicklung die relativen Anteile an Fruktanen mit niedrigem Polymerisationsgrad abnahmen und die

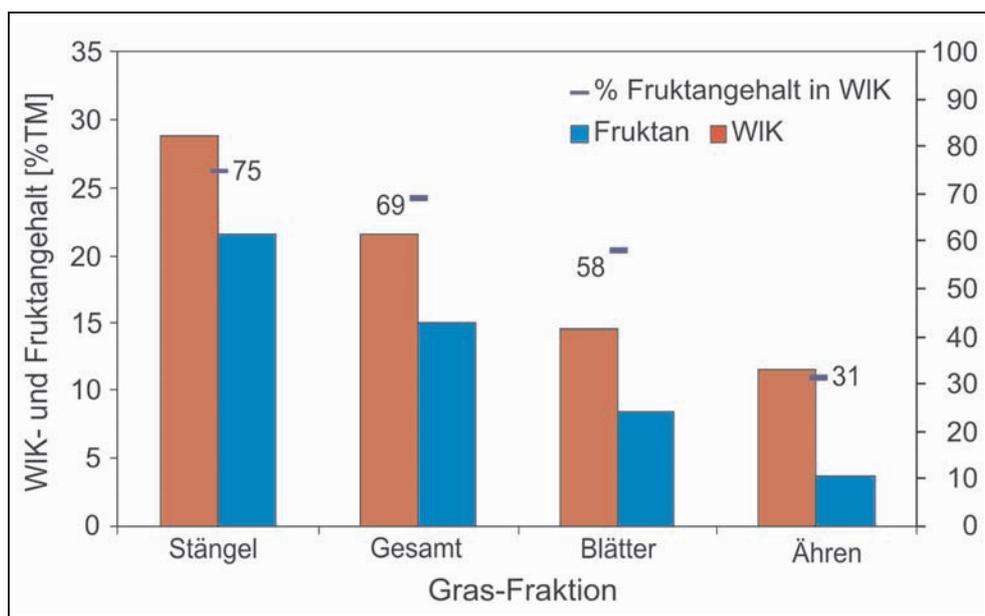


Abb. 4. Gehalte an WIK und an Fruktan, sowie Angaben des prozentualen Anteils des Fruktans an den WIK verschiedener Pflanzenfraktionen, dargestellt als Mittelwert aller Sorten zur 10. und 11. Ernte des Jahres 2007.

mit höherem DP zunehmen (Abb. 5a, b). Im Mittel aller Erntetermine wies die Sorte Aberavon in den Ganzpflanzenproben einen mit 3,7 % geringfügig höheren relativen Anteil an kurzkettigen Fructooligosacchariden auf als die Sorte Respect. Unterschiede zwischen beiden Sorten waren auch in den fraktionierten Pflanzenteilen, den Blättern (nicht dargestellt) und Stängeln (Abb. 6a, b), zu beobachten. In der Stängelfraktion wies die Sorte Aberavon zu den Ernteterminen 6 bis 11 einen um durchschnittlich 9,4 % höheren Anteil kurzkettiger Fructooligosaccharide auf als die Sorte Respect, während bei Respect im Verlauf der Pflanzenentwicklung die relativen Anteile mittel- und langkettiger Fructooligosaccharide stärker anstiegen als bei Aberavon.

**Diskussion**

Entsprechend den Erwartungen (BUNDESSORTENAMT, Beschreibende Sortenliste 2007), wies die Hochzuckersorte (HZG) Aberavon höhere WIK- und Fruktan-Gehalte auf als die anderen Sorten. Im parallel zu dem vorliegenden Zeitreihenversuch an zwei Standorten durchgeführten

mehrwährigen Sortenversuch beobachtete SOUFAN (2008) bei der Sorte Aberavon und zwei weiteren HZG-Sorten (Aberdart und Abersilo) im Vergleich zu diploiden Sorten der gleichen Reifegruppe ebenfalls deutlich höhere WIK-Gehalte. Auch SMITH et al. (1998) fanden bei englischen Sorten von *Lolium perenne*, die auf hohe WIK-Gehalte selektiert worden waren, während mehrerer Wachstumssaisons und in verschiedenen Umwelten Australiens stets höhere WIK-Gehalte als bei dort heimischen Sorten. Solche Unterschiede wurden auch bei Evaluierungen dieser oder mit ihnen verwandter HZG-Sorten in Großbritannien beobachtet (HUMPHREYS, 1989a; GILLILAND et al., 2003).

Das Gehaltsniveau der wasserlöslichen Kohlenhydrate (WIK) veränderte sich während des Entwicklungsverlaufs der Pflanzen. Hierbei stellte die Phase des Ährenschiebens einen besonders markanten Einschnitt dar. Die Gehalte erreichten generell bis zu Beginn des Ährenschiebens ihr Maximum und fielen danach wieder ab, wie es auch von anderen Autoren bei verschiedenen Gräsern beobachtet wurde (KÜHBAUCH und VOIGTLÄNDER, 1974; HOPF, 1982). Das Ausmaß der Speicherung wasserlöslicher Kohlenhydrate ist von der Photosyntheserate ei-

Tab. 3. Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WIK) und an Fruktan im Verlauf des ersten Aufwuchses des Jahres 2006 in Abhängigkeit von der Tageszeiten (8 Uhr und 13 Uhr) im Mittel der fünf Sorten, aller Ernten und der beiden N-Düngungsstufen (normal und niedrig)

Tageszeiten	WIK (% i. d. TM)	N	SD	Fruktan (% i. d. TM)	N	SD
8 Uhr	28,8 a	40	6,7	21,4 a	40	7,8
13 Uhr	29,0 a	40	5,9	19,8 b	40	7,1

Signifikante Unterschiede gelten für Werte in derselben Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben bei P < 0,05, SD = Standardabweichung

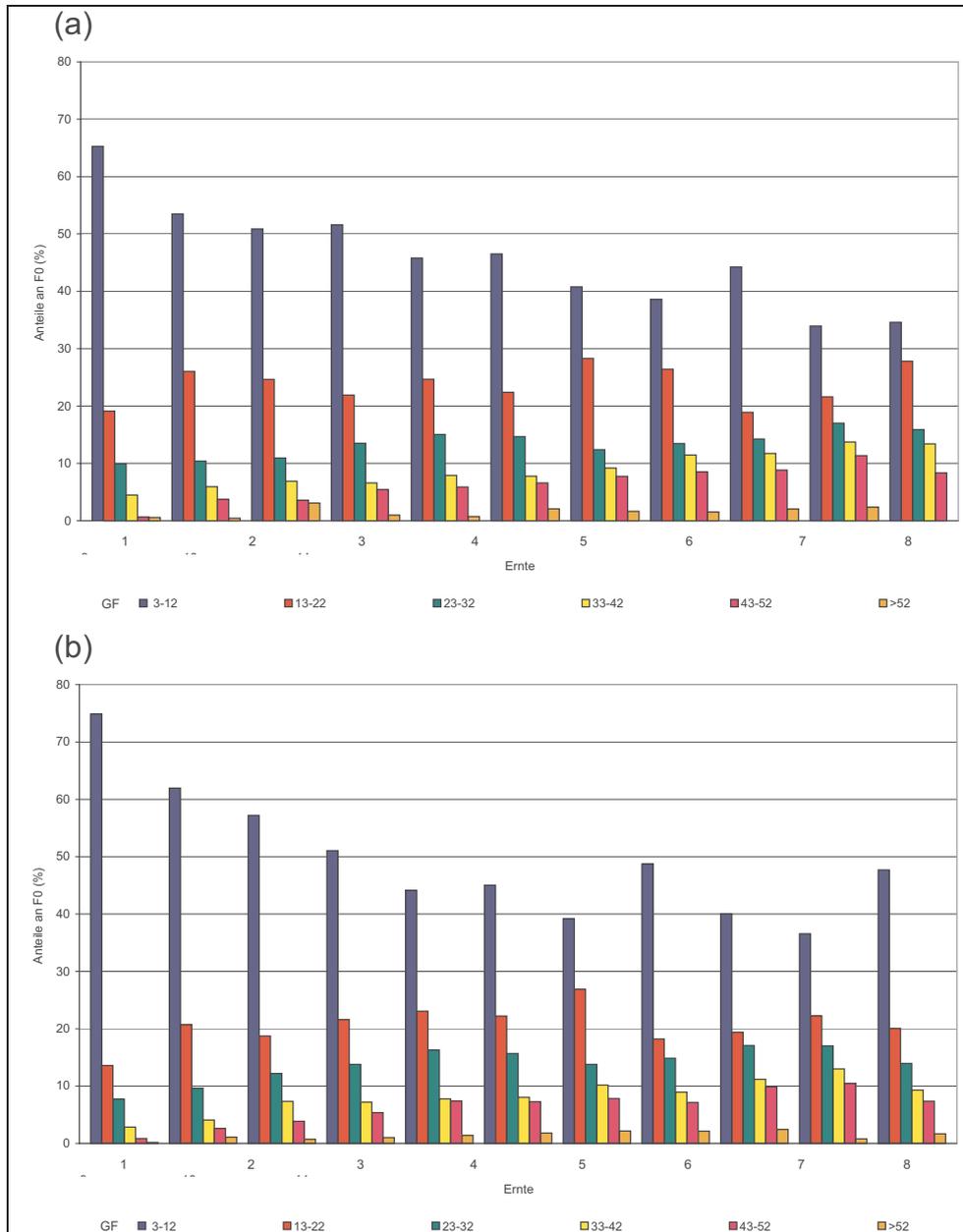
**Tab. 4. Gehalte an wasserlöslichen Kohlenhydraten (WIK) und an Fruktan im Verlauf des ersten Aufwuchses des Jahres 2006 in Abhängigkeit von der N-Düngungsstufe (normal und niedrig) im Mittel der fünf Sorten, aller Ernten und der beiden Tageszeiten (8 Uhr und 13 Uhr)**

N-Düngungsstufen	WIK (% i. d. TM)	N	SD	Fruktan (% i. d. TM)	N	SD
Normaldüngung	24,6 b	40	4,7	15,3 b	40	5,0
Niedrigdüngung	33,3 a	40	4,5	26,0 a	40	5,4

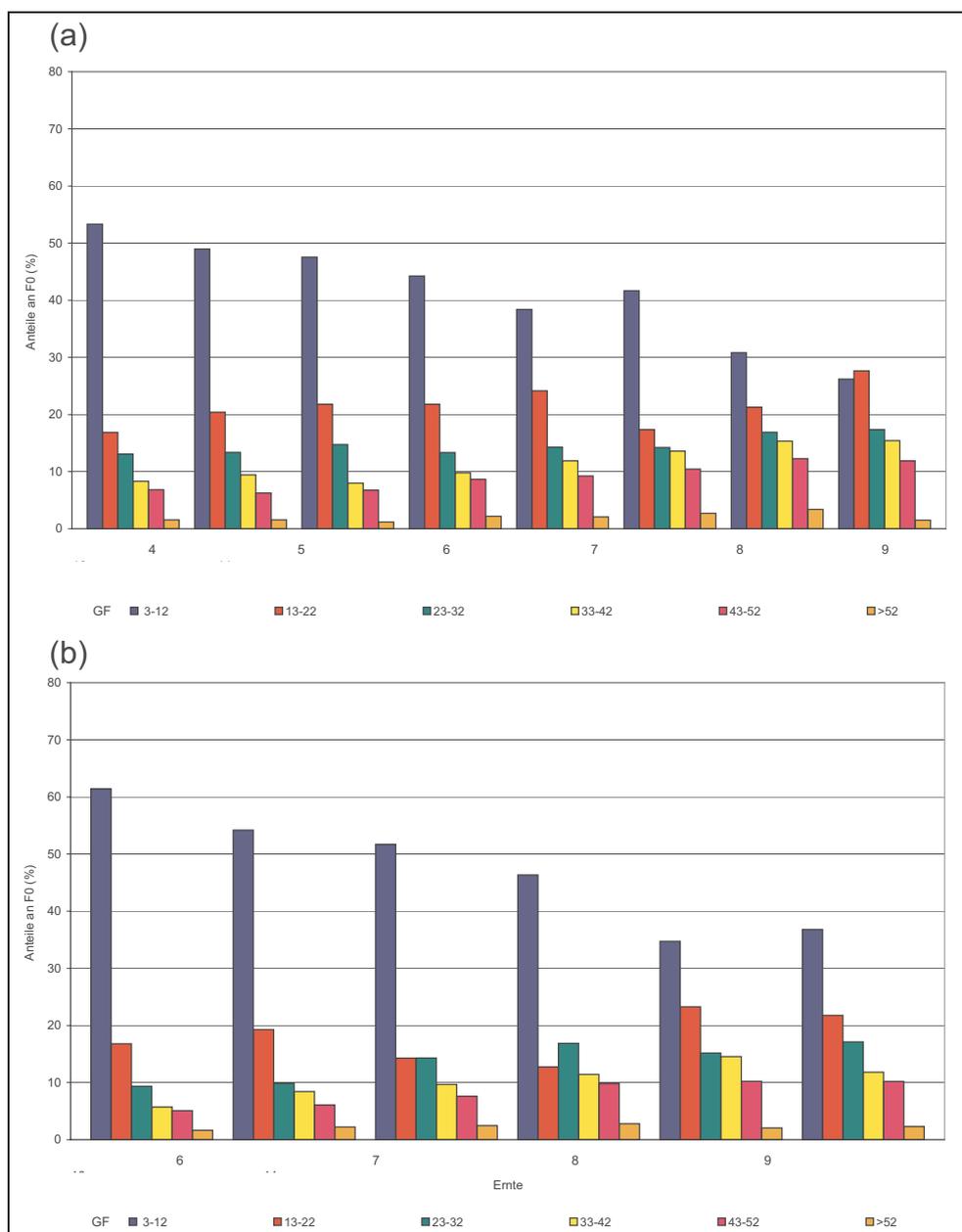
Signifikante Unterschiede gelten für Werte in derselben Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben bei  $P < 0,05$ , SD = Standardabweichung

nerseits und dem Verbrauch von Kohlenhydraten für Wachstum und Atmung der Pflanze andererseits abhängig (FULKERSON und DONAGHY, 2001). Ist der Energiebedarf der Pflanze hoch, wie z. B. in Phasen schnellen Wachs-

tums oder zur Blüte, so sinkt die WIK- und Fruktankonzentration, bei reduziertem Wachstum und gleichbleibender Photosyntheseaktivität steigt sie hingegen (LONGLAND und CAIRANS, 2000).



**Abb. 5. Relative Anteile an Fructooligosacchariden (FO) unterschiedlichen Polymerisationsgrades in Ganzpflanzenproben (a) der Sorte Respect und (b) der Sorte Aberavon zu allen Ernten des Jahres 2007.**



**Abb. 6.** Relative Anteile an Fructooligosacchariden (FO) unterschiedlichen Polymerisationsgrades in Stängelproben (a) der Sorte Respect und (b) der Sorte Aberavon zu Ernten des Jahres 2007.

Die Konzentrationen an WIK und damit auch an Fruktan können generell diurnalen Schwankungen unterliegen (KÜHBAUCH, 1978). Während jedoch in der vorliegenden Untersuchung die WIK-Gehalte zu den untersuchten Tageszeiten (8 und 13 Uhr) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, waren die Fruktangehalte morgens höher als mittags. LONGLAND und CAIRNS (2000) fanden hingegen den niedrigsten Gehalt in den frühen Morgenstunden und den höchsten in den Nachmittags- und frühen Abendstunden. Möglicherweise wäre bei größeren Zeitabständen zwischen den Ernten auch in der vorliegenden Untersuchung ein ähnlicher Anstieg zu verzeichnen gewesen. Als Ursache für tageszeitliche Fruktanschwankungen diskutieren LONGLAND und CAIRNS (2000) z. B. unterschiedliche Temperaturen, Lichtintensitäten sowie auch Fruktanreserven vom Vortag.

Ein weiterer maßgeblicher Einflussfaktor auf das Konzentrationsniveau und die Verteilung der Kohlenhydrate im Stoffwechsel der Pflanzen ist das Angebot an Nährstoffen, insbesondere an Stickstoff und Kalium (HEHL und MENGEL, 1972). Im Verlauf des ersten Aufwuchses des ersten Versuchsjahres (2006) führte die normale N-Düngung im Mittel der Sorten und der Ernten zu deutlich niedrigeren Konzentrationen an WIK und an Fruktan als die niedrige N-Düngung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch AUDA et al. (1966), MATTHES (1986), sowie LAMPETER et al. (1973). Höhere Stickstoffgaben führen zur Vergrößerung der Blattflächen und höheren Chlorophyllgehalten und so zur Begünstigung der Photosynthese. Dies führt zu einem verstärkten Bedarf an WIK für die Proteinsynthese sowie für das Wachstum und die Triebbildung, was wiederum einen Abfall der WIK-Konzentrationen zur Folge hat (HEHL und MENGEL, 1972).

Die in den Blättern und insbesondere in den als Hauptspeicher fungierenden Stängeln akkumulierten Fruktane variierten nicht nur in ihrer Quantität, sondern auch in ihrer Qualität und zeigten z. T. spezifische Polymerisationsprofile in Abhängigkeit von Sorte und Entwicklungsphase der Pflanzen. Generell wurden im Laufe der Pflanzenentwicklung Fruktane mit zunehmend höherem Polymerisationsgrad aufgebaut. Ein Unterschied zwischen der Niedrig-Zucker-Sorte Respect und der Hoch-Zucker-Sorte Aberavon scheint jedoch darin zu bestehen, dass dieser Prozess bei Respect kontinuierlich nach diesem Muster abläuft, während sich bei Aberavon andeutet, dass verstärkt kurzkettige Polymere gebildet werden und die nachfolgenden längerkettigen Fraktionen nicht in dem Maße aufgebaut werden wie bei der Sorte Respect. Dadurch steht diese kurzkettigere Fraktion vermutlich in einem unmittelbaren Austausch mit dem Assimilatpool der metabolischen Kohlenhydrate.

Die unterschiedlichen Fruktan-Profile von Respect und Aberavon könnten sich aus genetischen Unterschieden der Fruktan-metabolisierenden Enzyme oder ihrer Regulation ergeben, wie es TURNER et al. (2002) für eine von ihnen untersuchte Hoch-Zucker- (Aurora) im Vergleich mit einer Niedrig- bis Normal-Zucker-Weidelgrassorte (Perma) diskutieren. Hier besaß jedoch im Gegensatz zu den vorliegenden Beobachtungen die Hoch-Zucker-Sorte einen höheren Anteil hochpolymerer Fruktane als die Niedrig-Zucker-Sorte. Möglicherweise besaß sie hoch-aktive Transferasen zur schnellen Synthese großer Polymere oder weniger aktive Fruktan-Exohydrolasen (TURNER et al., 2002).

Die HZG-Sorte Aberavon zeichnete sich auch durch eine hohe Verdaulichkeit aus (SOUFAN, 2008). Ob der Polymerisationsgrad der Fruktane, d. h. ein Qualitätsaspekt in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt oder lediglich die Quantität der WIK, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch eine geeignete Kombination u. a. von Sortenwahl, N-Düngung und Schnittregime, die Höhe des Niveaus der WIK und ihre Verfügbarkeit im Grundfutter günstig beeinflusst werden kann.

## Danksagung

Die Autoren danken Melanie SCHÜTT und Dirk HILLEGEIST für die ausgezeichnete technische Assistenz.

## Literatur

- AUDA, H., R.E. BLASER, R.H. BROWN, 1966: Tillering and carbohydrate contents of orchardgrass as influenced by environmental factors. *Crop. Sci.* **6**, 139-143.
- BUNDESSORTENAMT, 2007: Beschreibende Sortenliste 2007, Futtergräser, Esparssette, Klee, Luzerne. Bundessortenamt.
- FULKERSON, W.J., D.J. DONAGHY, 2001: Plant-soluble carbohydrate reserves and senescence – key criteria for developing an effective grazing management system for ryegrass-based pastures: a review. *Austr. J. Exp. Agric.* **41**, 261-275.
- GILLILAND, T.J., P.D. BARRETT, R.E. AGNEW, A.M. FEARON, F.E.A. WILSON, 2003: Variation in herbage quality and grazing value traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Vortr. Pflanzenzüchtung* **59**, 11-19.
- GUERRAND, D., J.C. AVICE, N. PAVIS, M.P. PRUD'HOMME, J. BOUCAUD, 1999: Fructan biosynthesis in *Lolium perenne*: appraisal of soluble and insoluble enzymatic pathways. *New Phytol.* **141**, 109-118.
- HACK, H., H. BLEIHOLDER, L. BUHR, U. MEIER, U. SCHNOCK-FRICKE, R. STRAUSS, E. WEBER, A. WITZENBERGER, 1992: Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. –Erweiterte BBCH-Skala, Allgemein. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **44** (12), 265-270.
- HEHL, G., K. MENGEL, 1972: Der Einfluss einer variierten Kalium- und Stickstoffdüngung auf den Kohlenhydratgehalt verschiedener Futterpflanzen. *Landwirtsch. Forsch., Sonderheft* **27** (2), 117-129.
- HENDRY, G.A.F., 1993: Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* **123**, 3-14.
- HOPF, M., 1982: Gehalte, Molekulargewichte und mikrobieller Abbau von Fruktosan aus *Dactylis glomerata*, *Pheum pratense* und *Lolium perenne*, Freising-Weihenstephan, Dissertation, TU München.
- HUMPHREYS, M.O., 1989a: Water-soluble carbohydrates in perennial ryegrass breeding. I. Genetic differences among cultivars and hybrid progeny grown as spaced plants. *Grass and Forage Science* **44**, 231-236.
- HUMPHREYS, M.O., 1989b: Water-soluble carbohydrates in perennial ryegrass breeding. II. Cultivar and hybrid progeny performance in cut plots. *Grass and Forage Science* **44**, 237-244.
- HUMPHREYS, M.O., R.S. YADAV, A.J. CAIRNS, L.B. TURNER, J. HUMPHREYS, L. SKØT, 2006: A changing climate for grassland research. *New Phytologist* **169**, 9-26.
- KÜHBAUCH, W., 1978: Die Nichtstrukturkohlenhydrate in Gräsern des gemäßigten Klimabereiches, ihre Variationsmöglichkeiten und mikrobielle Verwertung. *Landwirtsch. Forschung* **31**, 251-268.
- KÜHBAUCH, W., G. VOIGTLÄNDER, 1974: Vegetationskegelenwicklung und Variabilität von Zuckergehalten im Knäulgras (*Dactylis glomerata* L.). *Z. Acker- und Pflanzenbau* **140** (84), 85-99.
- LAMPETER, W., H. MATTHIAS, A. TCHAPTCHET, 1973: Untersuchungen über die Verdaulichkeit, den Gehalt an löslichen Kohlenhydraten und Nitratstickstoff der Futtertrockenmasse einiger Gräserreinsaatensorten in Abhängigkeit von der N-Düngung. *Arch. Acker- u. Pflanzenbau u. Bodenkd.* **17** (5), 363-373.
- LONGLAND, A.C., A.J. CAIRNS, 2000: Fructans and their implications in the aetiology of laminitis. *Dodson and Horell Ltd., 3rd International Conference on Feeding Horses*, 52-55.
- MATTHES, K., 1986: Beziehungen zwischen Sortencharakter und den Gehalten wasserlöslicher Kohlenhydrate sowie verschiedener Strukturbestandteile bei der Art *Lolium perenne* L.; Dissertation, Universität Hohenheim.
- MILLER, L.A., M.A. NEVILLE, D.H. BAKER, R.T. EVANS, M.K. THEODOR, J.C. MACRAC, 1999: Milk production from dairy cows offered perennial ryegrass selected for high water soluble carbohydrate concentrations compared to a control grass. *Proceedings of the British Society of Animal Science (BSAS) Annual Meeting*, Scarborough, UK, 22-24 March 1999. *Penicuik, UK: BSAS*, 208.
- MILLER, L.A., J.M. MOORBY, D.R. DAVIES, M.O. HUMPHREYS, N.D. SCOLLAN, J.C. MACRAC, M.K. THEODOUROU, 2001: Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Milk production from late-lactation dairy cows*. *Grass and Forage Science* **56**, 383-394.
- PAVIS, N., N.J. CHATTERTON, P.A. HARRISON, S. BAUMGARTNER, W. PRAZNIK, J. BOUCAUD, M.P. PRUD'HOMME, 2001: Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**, 83-95.
- SMITH, K.F., R.J. SIMPSON, R.N. ORAM, K.F. LOWE, K.B. KELLY, P.M. EVANS, M.O. HUMPHREYS, 1998: Seasonal variation in the herbage yield and nutritive value of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars with high or normal herbage water-soluble carbohydrate concentrations grown in three contrasting Australian dairy environments. *Austral. J. Exp. Agr.* **38**, 821-830.
- SOUFAN, W., 2008: Untersuchungen auf wasserlösliche Kohlenhydrate, Ertragsleistung und Inhaltsstoffe bei Futtergräsern zur Verbesserung der Verdaulichkeit. *Dissertation, Universität Göttingen*.
- TURNER, L.B., M.O. HUMPHREYS, A.J. CAIRNS, C.J. POLLOCK, 2002: Carbon assimilation and partitioning into non-structural carbohydrate in contrasting varieties of *Lolium perenne*. *J. Plant Physiol.* **159**, 257-263.
- WILKINS, P.W., M.O. HUMPHREYS, 2003: Progress in breeding forage grasses for temperate agriculture. *Journal of Agricultural Science* **140**, 129-150.