

Aus dem
Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Selektionsverhalten von Pferden in Bezug auf Jakobs-Kreuzkraut
(*Senecio jacobaea* L.) im Heu**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Louisa Esmeralda Maria Sroka
aus Essen, Deutschland

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Ingrid Vervuert

Gutachter: Prof. Dr. Ingrid Vervuert, Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden
und Diätetik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Jessika-Maximiliane Cavalleri, Universitätsklinik für Pferde,
Klinische Abteilung für Interne Medizin Pferde, Veterinärmedizinische
Fakultät Wien.

Tag der Verteidigung: 19.07.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Kreuzkräuter	2
2.2	Jakobs-Kreuzkraut	2
2.2.1	Taxonomie und Wachstum	2
2.2.2	Verbreitung von Jakobs-Kreuzkraut	3
2.2.3	Pyrrolizidinalkaloide	4
2.2.4	Krankheitsbild Pferd	6
2.2.5	Toxische Mengen	9
2.2.6	Bekämpfungsmaßnahmen	9
2.2.6.1	Vorbeugung	9
2.2.6.2	Mechanische Verfahren	10
2.2.6.3	Chemische Verfahren	11
2.2.6.4	Biologische Verfahren	11
2.3	Selektionsverhalten von Pferden	11
2.3.1	Entwicklung des Selektionsverhaltens im Fohlenalter	12
2.3.1.1	Lernen von der Mutter	12
2.3.1.2	Lernen von Artgenossen	13
2.3.2	Selektion nach Rohnährstoffen	14
2.3.3	Selektion nach Rohfasergehalten	15
2.3.4	Selektion aufgrund von negativen Erfahrungen	16
2.3.5	Selektion nach Geschmack und Geruch	16
2.4	Selektionsverhalten in Bezug auf Jakobs-Kreuzkraut	17
2.5	Rechtliche Einordnung	18
2.5.1	EU-Recht	18
2.5.2	Nationales Recht	18
3	Publikation	20
3.1	Horses' rejection behaviour towards the presence of <i>Senecio jacobaea</i> L. in hay	20
4	Diskussion	30
5	Zusammenfassung	35

Inhaltsverzeichnis

6	Summary	37
7	Literaturverzeichnis	39
8	Anhang	46
8.1	Liste der Vorträge im Rahmen dieser Thesis	46
8.2	Weitere Publikationen.....	46
8.2.1	Veröffentlichte Artikel	46
8.2.2	Veröffentlichte Konferenzbeiträge.....	47
9	Danksagung	48

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

ADF	Acid-Detergent-Fibre (Säure-Detergenz-Faser)
ADL	Acid-Detergent-Lignin (Säure-Detergenz-Lignin)
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CYP	Cytochrom P450
DE	Digestible Energy (verdauliche Energie)
GSH	Glutathion
JKK	Jakobs-Kreuzkraut
KGW	Körpergewicht
LiCl	Lithium-Chlorid
LLUR	Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein
NaCl	Natrium-Chlorid
NDF	Neutral-Detergent-Fibre (Neutrale-Detergenz-Faser)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
PA	Pyrrolizidinalkaloide
SJ	<i>Senecio Jacobaea</i> L.
SDH	Sorbitdehydrogenase
TDI	Tolerable Daily Intake
TP	Totalprotein
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein
γGT	Gamma-Glutamyltransferase

1 Einleitung

Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio jacobaea* L.) gehört zur Familie der Asteraceae und dem Genus *Senecio* (Kreuzkräuter) (CALONI und CORTINOVIS 2015, NEITZKE und BERENDONK 2011). Die krautigen Pflanzen wachsen bevorzugt auf humosen Sand- und Lehmböden und sind inzwischen weltweit verbreitet (SCHWABE 2014, STEGELMEIER 2011). Jakobs-Kreuzkraut enthält die, für Mensch und Tier toxischen, Pyrrolizidinalkaloide als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (WIEDENFELD 2011). Durch die Aufnahme von Jakobs-Kreuzkraut können schwere Intoxikationen bei Pferden und anderen Tierarten hervorgerufen werden. Akute Intoxikationen durch Jakobs-Kreuzkraut sind bei Pferden kaum beschrieben, da eine sehr hohe Menge Pflanzenmaterial innerhalb von 1-2 Tagen aufgenommen werden müsste (PETZINGER 2011b). Deutlich häufiger kommt es zu versehentlichen, wiederholten Aufnahmen kleiner Mengen Jakobs-Kreuzkraut über einen längeren Zeitraum (Wochen - Monate). Durch Akkumulation der Pyrrolizidinalkaloide in der Leber kann es zu chronischen Intoxikationen im Sinne einer Seneciose kommen. Zu den Symptomen zählen Ikterus, Photodermatitis, neurologische Defizite (hepatoencephales Syndrom) und Ataxie (ANADÓN et al. 2018, PANTHER et al. 2018, STEGELMEIER 2011, PETZINGER 2011b). In den letzten Jahren hat der Bestand von Jakobs-Kreuzkraut deutlich zugenommen, wodurch es vermehrt zur Heukontamination kommen kann (METZING et al. 2018, LÜTT UND HUCKAUF 2017). In einigen Veröffentlichungen wird beschrieben, dass Pferde Jakobs-Kreuzkraut auf der Weide aufgrund seines bitteren Geschmacks meiden, vorausgesetzt es steht genügend anderes Futter zur Verfügung (HUSSAIN et al. 2018, PETZINGER 2011b). Über das Selektionsverhalten von Pferden bezüglich Jakobs-Kreuzkraut im Heu gibt es kaum Berichte. Da die Pflanzen bei der Trocknung zumindest den Großteil ihrer Toxizität behalten, stellt die Aufnahme von kontaminiertem Heu ein Gesundheitsrisiko für Pferde dar (KALTNER et al. 2018, NEITZKE und BERENDONK 2011, BERENDONK et al. 2010, CANDRIAN et al. 1984). Die Bedeutung dieses Problems hat sich mit der in den letzten Jahren auftretenden Raufutterknappheit noch weiter verschärft (VERVUERT 2020). Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob Pferde in der Lage sind, Jakobs-Kreuzkraut unter standardisierten Bedingungen aus kontaminiertem Heu auszusortieren. Den Pferden in dieser Studie wurde, neben einer ad libitum Heufütterung, kontaminiertes (5% und 10% Jakobs-Kreuzkraut) Heu vorgelegt. Das Aufnahme- bzw. Selektionsverhalten wurde dokumentiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pferde unter ad libitum Heufütterung in der Lage sind, Jakobs-Kreuzkraut aus dem Heu auszusortieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Kreuzkräuter

Kreuzkräuter (Greiskräuter, *Senecio* L.) gehören zur Familie der Asteraceae und kommen häufig auf Weiden und Feldern vor. Diese Gattung enthält mehr als 1200 Spezies, von denen 25 für ihre Toxizität im Sinne einer Seneciose bekannt sind (ANADÓN et al. 2018). Die toxischen Wirkstoffe sind im Falle von Kreuzkräutern die Pyrrolizidinalkaloide (FROHNE und PFÄNDER 2004). Diese werden im Körper unterschiedlich verstoffwechselt und bestimmen durch ihre Zusammensetzung in der Pflanze deren Toxizität (XU et al. 2019, CREWS und ANDERSON 2009). Als sehr häufig vorkommende Spezies werden das gemeine Kreuzkraut (*Senecio vulgaris* L.) und das Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio jacobaea* L.) beschrieben (METZING et al. 2018). Beide Vertreter weisen eine vergleichbar hohe Toxizität für Mensch und Tier auf (FROHNE und PFÄNDER 2004). Des Weiteren kommen in Deutschland das schwach giftige raukenblättrige Kreuzkraut (*S. erucifolius* L.) sowie das gewöhnliche Wasserkreuzkraut (*S. aquaticus* Hill.), das schmalblättrige Kreuzkraut (*S. inaequidens* DC.) und das ebenfalls schwach giftige Fuchs'sche Greiskraut [*S. ovatus* (G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) Hoppe] häufig vor. Arten wie z.B. das Frühlingskreuzkraut (*Senecio vernalis* Waldst. & Kit.) treten seltener und als Neophyt auf (METZING et al. 2018). Im mitteleuropäischen Raum kommen nur krautige Vertreter, teilweise als massenhafte Verbreitung, vor (FROHNE und PFÄNDER 2004).

2.2 Jakobs-Kreuzkraut

2.2.1 Taxonomie und Wachstum

Jakobs-Kreuzkraut gehört zur Familie der Asteraceae und zur Gattung der Kreuzkräuter (CALONI und CORTINOVIS 2015). Es handelt sich hierbei um eine zweijährige Pflanze, die im ersten Jahr nur eine Blattrosette mit ca. 20-30 cm langen Einzelblättern bildet. Erst im zweiten Jahr entwickelt sich dann die Sprossachse mit charakteristischen gänseblümchenartigen Blütenständen. Die Blütezeit von Jakobs-Kreuzkraut findet von Juni bis Oktober statt; mit dem Höhepunkt um Jakobi (25.07.), welcher der Pflanze ihren Namen verleiht. Die Blüten erscheinen als Doldentrauben aus bis zu 20 gelben Blütenköpfen mit einem Durchmesser von 15-25 mm. Der Stängel ist grün und an der Basis häufig rötlich bis lila. Zudem ist der Stängel spinnweben-artig behaart und kantig gerillt. Die Blätter sind fiederteilig, gegenständig, stehen rechtwinklig ab und besitzen eine schwach behaarte Unterseite.

Literaturübersicht

Nach der Blütezeit entwickeln sich Samen, die meist nicht weiter als 50 m vom Wind getragen werden. Nach der Samenbildung stirbt die Mutterpflanze ab. Die produzierten Samen benötigen zur Keimung einen offenen Boden sowie vegetationsarme, unbeschattete Bereiche. Unter solchen Bedingungen können die Samen bis zu 25 Jahre überleben, bevor sie auskeimen. Die Pflanze bildet eine Pfahlwurzel mit zahlreichen Faserwurzeln, die einen Umkreis von 30 cm um die Pfahlwurzel erreichen und aus deren Resten neue Pflanzen entstehen können (LÜTT und HUCKAUF 2017, NEITZKE und BERENDONK 2011).

Im Heu ist Jakobs-Kreuzkraut durch die rötlich-lila Färbung des Stängels, die Behaarung von Stängel und Blättern sowie an den teilweise gut erhaltenen gelben Blüten zu erkennen. Außerdem ist der Stängel beim Anbrechen mit flaumigem, schaumstoffähnlichem Material gefüllt (LÜTT und HUCKAUF 2017, SCHWABE 2014, NEITZKE und BERENDONK 2011).



Abbildung 1: Darstellung von Jakobs-Kreuzkraut im Heu.

2.2.2 Verbreitung von Jakobs-Kreuzkraut

Jakobs-Kreuzkraut gilt in Westeuropa als heimische Grünpflanze. Sie wurde versehentlich nach Osteuropa, Südafrika, Australien, Neuseeland und Nordamerika eingeschleppt und kommt somit heute nahezu weltweit vor (NEITZKE und BERENDONK 2011, STEGELMEIER 2011).

Die Pflanzenpopulation in Deutschland wird nach aktueller Bewertung der roten Liste und der Gesamtartenliste der Farn- und Blütenpflanzen durch METZING et al. (2018) als sehr hoch mit einem gleichbleibenden längerfristigen und einem deutlich zunehmenden kurzfristigen Bestand angegeben.

Literaturübersicht

Diese Bewertung deckt sich mit der Angabe des Landesamts für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, welches eine eskalative Verbreitung von Jakobs-Kreuzkraut in den letzten Jahren verzeichnet. Dieses starke Wachstum wird auf die folgenden Gründe zurückgeführt (LÜTT und HUCKAUF 2017):

- Zunahme von Brachflächen seit den 1990er Jahren
- Zunahme der Stickstoffexposition über die Luft (Stickstoffdusche)
- Zunahme der Phosphorsättigung im Boden durch langjährige und intensive Düngung
- Förderung der Konkurrenzkraft durch Eindringen nicht heimischer Genotypen aus dem Garten- und Landschaftsbau
- Einsaat als Straßenbegleitgrün
- Klimawandel
- Natürliche Populationsdynamik

Jakobs-Kreuzkraut wächst bevorzugt auf humosen Lehm- und Sandböden an mehr oder weniger nährstoff- und basenreichen Standorten mit einem pH-Optimum von fünf. Besonders auf Pferdeweiden wird das Wachstum von Jakobs-Kreuzkraut durch die teilweise selektive Fressweise der Pferde im Frischaufwuchs und den festgetretenen Böden mit offenen Spalten begünstigt (SCHWABE 2014, NEITZKE und BERENDONK 2011, PETZINGER 2011a).

2.2.3 Pyrrolizidinalkaloide

Kreuzkräuter erhalten ihre Toxizität für Mensch und Tier durch die enthaltenen Pyrrolizidinalkaloide (PA). Sie gehören neben Flavonoiden, Phenylpropanoiden, Benzoquinonen und Carbohydraten zu den Hauptmetaboliten der Pflanze (O'KEEFFE et al. 2015).

PA kommen hauptsächlich in Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae und Boraginaceae vor und können beim Menschen hepatotoxisch, karzinogen, genotoxisch und teratogen wirken (WIEDENFELD 2011). Für Pferde wurde in Studien jedoch nur die Hepatotoxizität erforscht (CRAIG et al. 1991, MENDEL et al. 1988).

Die Vergiftungs- und Entgiftungswege von PA wurden ausführlich in Übersichten beschrieben (XU et al. 2019, YANG et al. 2019, RUAN et al. 2014, HE et al. 2010, FU et al. 2004, MATTOCKS und WHITE 1971):

PA können nach ihrer Necinbase in Platynecin-, Otonecin-, Retronecin- und Heliotridinetyphen eingeteilt werden, wobei Platynecintypen in der Toxizität eine untergeordnete Rolle spielen. Insgesamt sind rund 660 in der Natur vorkommende PA und deren N-Oxide bekannt. Alle

Literaturübersicht

Typen außer den Otonecintypen können N-Oxide bilden. Hepatotoxische PA enthalten eine ungesättigte Necinbase. Die größte toxische Wirkung besitzen PA vom Retronecintyp, welche als häufigste Gruppe in Jakobs-Kreuzkraut vorkommen (ANADÓN et al. 2018, CREWS und ANDERSON 2009).

In der Pflanze liegen die PA zu großen Teilen im N-Oxid-Zustand vor und zeigen somit vor der Metabolisierung ein geringes toxisches Potenzial. Sie sind wasserlöslich und können potenziell ausgeschieden werden. Meist ist eine metabolische Aktivierung der PA nötig, damit diese toxisch wirken. Die Verstoffwechslung kann über drei (FU et al. 2004) bzw. vier Wege (XU et al. 2019) erfolgen:

1. Oxidation in zwei Schritten (Dehydrogenation):
 1. Schritt: Hydroxilation der Necinbase an C3 oder C8 → Hyrdoxinecinderivat (OHPA).
 2. Schritt: Spontane Dehydratation → Dehydropyrrolizidin-Derivat (Pyrrolester, DHPA).
 - Toxifikation: Es können Pyrrol-Protein-Addukte oder Pyrrol-DNA-Addukte entstehen, die verantwortlich für Cytotoxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität sind.
 - Detoxifikation: Pyrrol-Ester können mit Wasser oder Glutathion (GSH) reagieren und ausgeschieden werden.
2. Hydrolyse der funktionellen Estergruppe an C7 und C9, um Necinbase und Necinsäure zu bilden. → Detoxifikation
3. N-Oxidation von der Necinbase zu den korrespondierenden N-oxiden:
 - Detoxifikation
 - Umgekehrt: Toxifikation
4. Glucuronidation durch Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase mit Anzeichen von deutlichen Speziesunterschieden.

Otonecintypen werden nur über zwei Wege metabolisiert (XU et al. 2019, FU et al. 2004):

1. Bildung des Pyrrolesters durch oxidative Demethylierung der Necinbase, gefolgt vom Ringschluss und Dehydratation mit denselben Effekten wie bei den Retronecintypen.
2. Hydrolyse der funktionellen Estergruppe mit Bildung der zugehörigen Necinbase und Necinsäure. → Detoxifikation

Zusätzlich konnten die Stoffwechselwege von Retrorsin N-Oxid, Riddelliin N-Oxid, Senecionin N-Oxid und Seneciophyllin N-Oxid anhand einer aktuellen Studie in Ratten genauer betrachtet werden. In Darm und Leber wurden die N-Oxide schnell (< 8 Stunden) NADPH-abhängig in ihre korrespondierenden PA umgewandelt. Die Reaktion war in beiden Organen unter anaeroben Bedingungen effektiver. Die Cytochrom-P450-abhängige Reaktion von dem PA zu den reaktiven Metaboliten (DHPA) und dem daraus folgenden Pyrrol-Protein-Addukt wurde hauptsächlich in der Leber unter aeroben Bedingungen beobachtet. Die Pyrrol-Protein-Addukte führten hierbei zur Phototoxizität (YANG et al. 2019).

In einer anderen Studie wurde die Umwandlung von verschiedenen PA in Pyrrol-Protein-Addukte als Biomarker für die Toxizität in Mäusen untersucht, um das unterschiedliche toxische Potenzial der PA zu beschreiben. Dabei waren die Pyrrol-Protein-Addukte bei der Verstoffwechslung von 12-gliedrigen makrozyklischen Diestern (Integerrimin, Retrorsin, Seneciophyllin, Senecionin und Riddelliin) vom Retronecintyp deutlich höher als die Pyrrol-Protein-Addukte bei der Verstoffwechslung makrozyklischer Diester vom Otonecintyp. Die Unterschiede werden auf eine größere wirksame Gruppe von Cytochrom P450 (CYPs) bei Retronecintypen zurückgeführt. Außerdem konnte die Bildung von einem Pyrrol-GSH-Konjugat und die damit einhergehende Entgiftung nachvollzogen werden. Beide Metabolisierungswege scheinen zu konkurrieren. Auch wenn genügend GSH zur Verfügung steht, werden Pyrrol-Protein-Addukte gebildet. Eine hohe Lipophilie scheint außerdem die Giftwirkung zu fördern, während hydrophilere PA leichter ausgeschieden werden können (RUAN et al. 2014).

2.2.4 Krankheitsbild Pferd

Durch die oben beschriebenen Wirkmechanismen von PA im Jakobs-Kreuzkraut kann es bei Pferden zu akuten oder chronischen Intoxikationen kommen. Um akute Intoxikationen mit Jakobs-Kreuzkraut auszulösen, müssen große Mengen der Pflanze aufgenommen werden, wodurch diese Art von Intoxikation sehr selten vorkommt (ANADÓN et al. 2018, PANTHER et al. 2018, PETZINGER 2011b). Auch wenn hierzu veröffentlichte Studien fehlen, gibt PETZINGER (2011b) eine benötigte Aufnahmemenge von 1-5% des eigenen Körpergewichts

Literaturübersicht

an Frischpflanzen über ein bis zwei Tage an. Somit müsste ein 600 kg Pferd mindestens 6 kg Frischpflanzen aufnehmen, um Symptome einer akuten Intoxikation zu zeigen. Häufiger kommt es durch die Kumulation von PA in der Leber zu chronischen Krankheitsgeschehen. Durch die kontinuierliche Aufnahme von kleineren Pflanzenmengen im frischen oder getrockneten Zustand kann es auch Monate oder Jahre nach der ersten Aufnahme, teilweise auch nach aufnahmefreien Zeiten, zu schweren Verläufen kommen. Dies macht den Nachweis von Jakobs-Kreuzkraut als Ursache für die Intoxikation häufig kompliziert (ANADÓN et al. 2018, PANTHER et al. 2018, PETZINGER 2011b, POHLMANN et al. 2005).

Die möglichen auftretenden Symptome und histologischen Befunde sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Literaturübersicht

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Befunde durch akute und chronische Jakobs-Kreuzkraut Intoxikationen beim Pferd.

Stadium		Befund	Referenzen
Akut		Hepatotoxizität (Toxizität an Niere, Gastrointestinaltrakt und Pankreas)	PETZINGER (2011b), STEGELMEIER (2011)
		Hämorrhagische und zentrolobuläre Lebernekrosen ohne Megalozytosen	
Chronisch	Klinische Symptome	Schwäche, Apathie, Anorexie	ANADÓN et al. (2018), PANTHER et al. (2018)
		Ikterus	PANTHER et al. (2018), ANADÓN et al. (2018), PETZINGER (2011b)
		Sekundäre Photodermatitis	PETZINGER (2011b)
		Inspiratorische Dyspnoe	
		Ataxie, Zentralnervöse Störungen („Head pressing“)	ANADÓN et al. (2018), PANTHER et al. (2018)
		Sehstörungen, Erblindung	ANADÓN et al. (2018)
		Ascites, Ödeme	PETZINGER (2011b)
	Blutbildveränderungen	Erhöhung von: γGT, AP, Bilirubin, ALAT, SDH, AST, Gallensäuren	STEGELMEIER (2011), CURRAN et al. (1996), CRAIG et al. (1991), GRABNER (1990), Giles (1983)
	Histologische Befunde	Hepatische Megalozytosen	PETZINGER (2011b), STEGELMEIER (2011)
		Venenocclusion der Leber und Lunge	
Proliferation der Gallengänge			
Fettige Degeneration der Leber, Leberzirrhose			

2.2.5 Toxische Mengen

CRAIG et al. (1991) fütterten acht Ponys mit pelletiertem Jakobs-Kreuzkraut bis zum Tod. Dazu wurden die Ponys in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt das kontaminierte Futtermittel bis zum Ableben, die andere Gruppe über einen Zeitraum von 60 Tagen. Die Ponys starben alle innerhalb von 49-406 Tagen nach der ersten Jakobs-Kreuzkraut Aufnahme. Wenn man den in der Studie genannten PA-Gehalt der genutzten Pflanzen und die Fütterungszeiten in Verbindung bringt, haben die Pferde in dieser Studie täglich zwischen 0,79 und 1,7mg PA/kg KGW aufgenommen (CRAIG et al. 1991).

MENDEL et al. (1988) fütterten neun Pferde mit gewöhnlichem Greiskraut (*Senecio vulgaris* L.) in gepresster Form (Würfel). Die Pferde nahmen das kontaminierte Futter über 89-159 Tage auf und erreichten somit eine mittlere Aufnahme von $233 \pm 9,2$ mg PA/kg KGW. Auch in dieser Studie verstarben alle Pferde (MENDEL et al. 1988).

PETZINGER (2011b) ermittelte einen Tolerable Daily Intake (TDI) von 1 µgPA/kg KGW bei Pferden, basierend auf verschiedenen Angaben zum TDI beim Menschen. Die genutzten Daten wurden aus Intoxikationsstudien mit Riddelliin bei Ratten gewonnen und durch einen Sicherheitsfaktor von 100 auf den Menschen übertragen.

Zusätzlich wurde in einem Bericht des NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (2003) ein NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level) für nicht-kanzerogene chronische Effekte bei Ratten von 0,01 mg PA/kg KGW angegeben.

2.2.6 Bekämpfungsmaßnahmen

2.2.6.1 Vorbeugung

Nach Angaben des Landesamtes für Landwirtschaft, Umwelt und Ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR) ist das Vorbeugen der Ansiedlung von Jakobs-Kreuzkraut eine sinnvolle Maßnahme auf Wiesen und Weiden. Dies kann durch die Förderung einer geschlossenen Grasnarbe z. B. mittels Schleppen, Düngen, Nach- bzw. Übersaat oder einer Nachmahd und somit der Verhinderung des Auskeimens bewirkt werden. Außerdem ist die Bildung von natürlichen Barrieren (z.B. Gehölzreihen) oder eines Pufferstreifens zum Schutz vor Samenflug im Umkreis von mindestens 20 Metern eine geeignete Maßnahme. Wenn eine nachhaltige Vorbeugung getroffen wird, können einzelne Pflanzen z.B. durch Ausstechen manuell entfernt werden (RABE und HUCKAUF 2017).

2.2.6.2 Mechanische Verfahren

Das mechanische Entfernen kann entweder durch Ausstechen von einzelnen Jakobs-Kreuzkrautpflanzen oder durch gezielte Mahd erfolgen. Beim Ausstechen muss darauf geachtet werden, dass die Wurzel möglichst in Gänze entfernt wird. Dies kann am besten während des Rosettenstadiums erfolgen, da die Wurzeln hier noch nicht so ausgeprägt sind, oder aber Mitte bis Ende Juni, weil die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt durch ihre Blüten am besten erkennbar und die Stängel gut zu greifen sind (HUCKAUF 2017b).

Die Mahd kann eine gute Alternative bei stärkerem Jakobs-Kreuzkrautbewuchs sein. Jedoch ist zu beachten, dass der Zeitpunkt eine erhebliche Rolle spielt. Bei einer zu frühen Mahd keimen die Pflanzen direkt wieder aus und kommen noch im selben Jahr zur Blüte. Ist der Zeitpunkt zu spät gewählt, überdauern die Pflanzen den Winter und werden mehrjährig. Ob die Mahd weiterverwendet werden kann, ist nicht definiert (HUCKAUF 2017b).

Um den besten Zeitpunkt für die Mahd zur Bekämpfung von Jakobs-Kreuzkraut festzulegen, haben SIEGRIST-MAAG et al. (2008) eine Studie mit drei unterschiedlichen Schnittzeitpunkten angefertigt:

1. Beginn der Blüte: Die Hälfte der Pflanzen hatte offene Blüten
2. Beginn des Verblühens: Die Hälfte der Pflanzen hatte erste verblühte Blüten
3. Beginn der Samenstände: Beim ersten Auftreten von Samenständen

Unabhängig vom Schnittzeitpunkt haben 40% der Pflanzen vier Wochen nach dem Schnitt wieder neue Triebe gebildet. Diese waren zwar nicht so hoch wie zuvor, wiesen allerdings eine signifikant höhere Anzahl von Trieben auf. Des Weiteren zeigten sich unabhängig von Schnittzeitpunkt ab August bei 20% der Pflanzen wieder neue Blüten. Aus den Ergebnissen der Studie ergab sich eine Schnittempfehlung, die die Versamung von Jakobs-Kreuzkraut verhindern soll. Hierfür sollte der erste Schnitt vorgenommen werden, sobald mehr als die Hälfte der Individuen offene Blüten zeigt (ca. Ende Juni). Der zweite Schnitt sollte in etwa acht Wochen später stattfinden, wenn die Hälfte der Wiederaustreiber erneut Blüten zeigt. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass das Schnittgut abgeführt wird, da auch geschnittene Pflanzen noch zur Reife und somit zur Samenbildung kommen können. Frühere Schnittzeitpunkte würden demnach keinen Sinn ergeben, da die Pflanzen sofort wieder austreiben und somit dreimal geschnitten werden müssten. Dieses Management sollte aufgrund der Mehrjährigkeit von Jakobs-Kreuzkraut über einige Jahre durchgehalten werden, um ein Zurückdrängen der Pflanze zu erreichen (SIEGRIST-MAAG et al. 2008).

Zusätzlich zur Mahd wird vom LLUR das Mulchen als Möglichkeit angegeben sowie ein kompletter Umbruch als Notlösung. Zudem können die Pflanzen mit Brennern oder Infrarotgeräten bearbeitet werden (HUCKAUF 2017b).

2.2.6.3 Chemische Verfahren

Chemische Behandlungen sollten im Rosettenstadium oder bei einer Wuchshöhe von 10-20 cm durchgeführt werden. Die verfügbaren Herbizide sind dabei nach Angaben des LLUR nicht nachhaltig und müssen auch in den Folgejahren eingesetzt werden. Zudem ist nach der chemischen Behandlung eine Nachsaat erforderlich, um die entstandenen Lücken zu schließen. Am wirksamsten wird hierbei Simplex™ (Wirkstoff: Fluroxypyr und Aminopyralid) beschrieben, aber auch andere Herbizide können zur Eindämmung von Jakobs-Kreuzkraut führen. Nach dem Einsatz ist wie auch bei anderen Herbiziden auf die Wartezeit zu achten (PFEIL 2017).

2.2.6.4 Biologische Verfahren

Als Alternative zu mechanischen und chemischen Bekämpfungsverfahren von Jakobs-Kreuzkraut können, besonders auf schlecht zugänglichen Flächen, biologische Methoden eingesetzt werden. Diese wurden bislang nur in Ländern eingesetzt, in denen Jakobs-Kreuzkraut nicht heimisch vorkommt (HUCKAUF 2017a). So wurde zum Beispiel in Kalifornien in den 1960er und 1970er Jahren ein nahezu 100-prozentiger Erfolg mit einer Kombination aus Jakobskrautbär (*Tyria jacobaeae*) und Jakobs-Kreuzkraut-Flohkäfer (*Longitarsus jacobaeae*) als natürliche Gegenspieler des Jakobs-Kreuzkrautes erzielt (PEMBERTON und TURNER 1990). Seitdem wurden mehrere Berichte von positiven Erfahrungen mit natürlichen Fraßfeinden von Jakobs-Kreuzkraut veröffentlicht. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Fraßfeinde in einem Räuber-Beute-Zyklus zum Jakobs-Kreuzkraut verhalten, sodass sich ihre Population dynamisch mit der der Jakobs-Kreuzkrautpflanzen verändert und somit anderen Pflanzen Raum zur Verbreitung gibt (TURNER und CESSSELLI 2013, MCEVOY et al. 1991).

2.3 Selektionsverhalten von Pferden

PROVENZA et al. (1992) beschrieben ausführlich das erlernte Selektieren von giftigen Pflanzen bei Herbivoren. Dabei wurde das Lernen in zwei Systeme aufgeteilt:

1. Aversives (post-ingestiv) System: aufgenommene Pflanzen können mit positiven Eigenschaften wie z. B. vorteilhafte Nährstoffzusammensetzung oder mit negativen

Eigenschaften wie Unwohlsein, meist bezogen auf das emetische System, verknüpft werden.

2. Kognitives (prä-ingestiv) System: diese Prozesse integrieren hierbei den Geruch und das Aussehen mit dem Geschmack. Dabei kann das kognitive Lernen wiederum in drei verschiedene Lernarten unterteilt werden:
 - a. Lernen von der Mutter
 - b. Lernen von Artgenossen
 - c. „Trial-and-Error“ Lernen durch Testen von Pflanzen

Beide Systeme sind hierbei aber eher eine theoretische Einteilung zum besseren Verständnis und greifen in der Praxis lückenlos ineinander. So ermöglichen sie Flexibilität in der Nahrungsvariation und Anpassung an unterschiedliche Bedürfnisse und Umweltfaktoren.

Die Schlussfolgerungen von PROVENZA et al. (1992) basieren hauptsächlich auf Studien über Wiederkäuer. Studien zu Pferden in diesem Bereich sind nur in geringem Umfang verfügbar und lassen Raum für weitere Forschung.

2.3.1 Entwicklung des Selektionsverhaltens im Fohlenalter

Herbivore lernen im Jungtieralter effektiver durch soziales Lernen als im Erwachsenenalter (PROVENZA et al. 1992). Das soziale Lernen kann in den ersten Lebensmonaten über die Mutter (NOLTE und PROVENZA 1992, PROVENZA et al. 1992, HOUPPT et al. 1990, HEPPER 1989) und im fortgeschrittenen Alter hauptsächlich über Artgenossen erfolgen (PROVENZA und BURRITT 1991).

2.3.1.1 Lernen von der Mutter

Das Selektionsverhalten von Jungtieren kann nach PROVENZA et al. (1992) durch die Mutter auf drei verschiedenen Wegen beeinflusst werden. Zum einen kann schon der Fetus in utero Nahrungsbestandteile wahrnehmen und somit Präferenzen entwickeln. Nach der Geburt können die Neugeborenen Gerüche und Geschmäcker der Muttermilch schmecken und riechen und später mit den passenden Pflanzen assoziieren. Wenn die Tiere nach ein paar Wochen anfangen zu grasen, orientieren sie sich an der Mutter und ahmen allmählich deren Fressverhalten nach (PROVENZA et al. 1992).

Während sich die Forschungen, auf die PROVENZA et al. (1992) ihre Schlussfolgerungen gründen, zu großen Teilen auf Wiederkäuer beziehen, haben BOLZAN et al. (2020) das Fressverhalten bei Fohlen in den ersten 130 Lebenstagen beobachtet. Es wurden sechs Fohlen und deren Mütter auf der Weide gehalten und dabei deren Futteraufnahme sowie Säugezeiten

und Koprophagie beobachtet. Die Ergebnisse deuteten auf eine Ausprägung des Selektionsverhaltens in drei Stufen hin (BOLZAN et al. 2020):

1. Explorative Phase (Lebenstag: 0-40): Bis zum 22. Tag nahmen die Fohlen kaum Pflanzen auf, sondern beleckten diese nur. In den darauffolgenden Tagen erhöhte sich die Zeit der Pflanzenaufnahme maßgeblich und die Fohlen testeten verschiedene Pflanzen in unterschiedlichen Mengen. Außerdem wurde Koprophagie beobachtet, die nach fünf Wochen bei vier von sechs Fohlen verschwand.
2. Spezialisierungsphase (Lebenstag: 40-110): Zwischen Tag 35 und Tag 60 wurde die höchste Diversität der Pflanzenaufnahme bei den Fohlen beobachtet. Die Vielfalt verringerte sich danach kontinuierlich. Es wurden Pflanzen oder Pflanzenteile bevorzugt gefressen und das Fressverhalten näherte sich nach und nach dem der Mutter an. Dennoch zeigten sich signifikante Unterschiede zur Ration der Mutterstute. Da ab diesem Zeitpunkt der Peak der Laktation der Mutterstuten überschritten war, mussten die Fohlen ihre Nährstoffe zumindest zu Teilen über die Pflanzen generieren. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine Veränderung und Stabilisierung der Darmflora zu erwarten.
3. Stabilisierungsphase (Lebenstag: 110-130): Die Futteraufnahme nahm weiterhin zu und das Futteraufnahmeverhalten unterschied sich nicht länger signifikant von der Mutter.

Die Ergebnisse von BOLZAN et al. (2020) weisen auf ein soziales Lernverhalten (Nachahmung des Fressverhaltens) des Fohlens von der Mutter hin, auch wenn in dieser Studie keine genetischen Untersuchungen oder Untersuchungen der Muttermilch stattgefunden haben, wodurch auch andere Komponenten eine Rolle spielen könnten. Ob die Fohlen nach diesen vier Monaten ihr Fressverhalten weiter verändern, wurde in der Studie nicht untersucht.

2.3.1.2 Lernen von Artgenossen

PROVENZA et al. (1992) stellten als weiteres kognitives Lernverhalten das Erlernen von Artgenossen vor. Dieses soll besonders im Jungtieralter effektiv sein, aber auch beim ausgewachsenen Pferd noch eine Rolle spielen.

In diesem Kontext testeten PROVENZA und BURRITT (1991), ob Lämmer trotz einer vorher konditionierten Futteraversion gegen *Cercocarpus montanus* (Erlenblatt-Bergmahagoni), diese spezifischen Pflanzen im sozialen Kontakt zu nicht konditionierten Tieren wieder vermehrt aufnehmen. In dieser Untersuchung erhielten vier Monate alte Lämmer nach Aufnahme von *C. montanus* oral LiCl-Gelatinekapseln, wodurch eine Aversion gegen die Pflanze erzeugt wurde. 16 weitere Lämmer wurden nicht aversiv konditioniert. Die Aufnahme von *C. montanus* bei den konditionierten Lämmern nahm signifikant ab. Nun wurden die konditionierten Lämmer in

eine heterogene Gruppe (konditionierte und nicht konditionierte Lämmer) und in eine homogene Gruppe (nur konditionierte Lämmer) aufgeteilt und die Aufnahme von *C. montanus* auf der Weide und im Stall überwacht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Lämmer in den heterogenen Gruppen signifikant mehr *C. montanus* aufnahmen als die Lämmer in den homogenen Gruppen. Somit sahen die Autoren soziale Einflüsse als wichtige Determinanten der Futterauswahl bei Schafen an (PROVENZA und BURRITT 1991).

2.3.2 Selektion nach Roh Nährstoffen

PROVENZA et al. (1992) beschrieben eine Selektion von Herbivoren nach post-ingestiven Effekten wie zum Beispiel eine förderliche Nährstoffzusammensetzung. Die aufgenommenen Nahrungsmittel können dann neuronal mit dem zugehörigen Geschmack und Geruch verknüpft werden und somit das nächste Mal bevorzugt gefressen oder gemieden werden.

In diesem Zusammenhang zeigten VILLALBA und PROVENZA (2000), dass Lämmer ein neuartiges Futter mit einem positiven post-ingestiven Ereignis wie der Nährstofffreisetzung im Darm assoziieren können. Lämmer wurden mit einem neuartigen aromatisierten Futter in Kombination mit einer Stärkeinfusion (*Sorghum bicolor subglabrescens*) in den Pansen gefüttert. Es wurde gezeigt, dass Lämmer den Verzehr des neuartigen aromatisierten Futters erhöhten, wenn Stärke in den Pansen infundiert wurde und abhängig von der aufgenommenen Menge an neuartigem Futter erhöht oder gesenkt wurde (VILLALBA und PROVENZA 2000).

VAN DEN BERG et al. (2016a) verglichen die Präferenz von Pferden zwischen proteinreicheren (XP: 27 %) und proteinärmeren (XP: 14 %) isokalorischen Rationen und fanden heraus, dass Pferde nach einer Adaptationsphase von mindestens vier Tagen eine deutlich größere Futteraufnahme bei proteinreichen Rationen zeigten als bei den proteinarmen Rationen. Zusätzlich wurden in diesem Versuch deutlich höhere Aufnahmen von Futtermitteln festgestellt, die mit einem nicht-kalorischem Süßungsmittel (2,25 %ige Erythritol/Stevia-Mixtur) versetzt waren oder wenn ein nicht-kalorischer, süßer Geschmacksstoff wie Kokosnuss oder Banane zugesetzt wurde. Hierbei wurde der Nährstoffgehalt als das stärkste Selektionskriterium wahrgenommen, gefolgt vom Geschmack (Süßstoff). Den geringsten Effekt hatte der Geruch. (VAN DEN BERG et al. 2016a).

REDGATE et al. (2014) testeten die Präferenz von Pferden in Bezug auf den Gehalt von Protein, Lipid und hydrolisierbaren Kohlenhydraten. Die Pferde in dieser Studie zeigten eine signifikant höhere Präferenz zu den Rationen mit erhöhtem Proteingehalt (XP: 11,6 %) und erhöhten hydrolisierbaren Kohlenhydraten (HCO-H: 13,9 %) als zu den fettreichen Rationen

(XL: 4,3 %). Voraussetzung war auch hier eine Adaptationsperiode von drei Tagen (REDGATE et al. 2014).

CAIRNS et al. (2002) zeigten bei Pferden eine Präferenz für energiereiche Rationen. Zunächst wurde die Schmackhaftigkeit von Minzgeschmack im Vergleich zu Knoblauchgeschmack in einer isokalorischen Rationen getestet, wobei der Minzgeschmack deutlich präferiert wurde. Danach wurde eine hochenergetische Ration (DE: 11,3 MJ/kg) und eine Ration mit niedrigerem Energiegehalt (DE: 9,3 MJ/kg) mit den beiden Geschmacksstoffen (Minze und Knoblauch) versetzt und die Aufnahme beobachtet. Die Pferde zeigten eine deutlich höhere Aufnahme des hochenergetischen Futters, auch wenn dieses mit dem weniger schmackhaften Knoblauchgeschmack versetzt war. Hierfür war eine Adaptationsperiode von mindestens 10 Mahlzeiten nötig (CAIRNS et al. 2002).

Alle drei beschriebenen Studien zeigen, dass neben dem Selektionsverhalten der Pferde nach Nährstoffen auch in allen Fällen eine Adaptationsperiode von mindestens drei Tagen nötig war, um die Nahrungsmittel anhand ihrer Nährstoffe zu unterscheiden.

Keine der Studien an Pferden hat post-ingestive Effekte so eindrücklich gezeigt wie die Studie von VILLALBA und PROVENZA (2000) bei Lämmern. Dennoch weisen sie darauf hin, dass auch bei Pferden solche Effekte möglich sein können.

2.3.3 Selektion nach Rohfasergehalten

Zusätzlich zu der Selektion nach Nährstoffen gibt es Studien über das Selektionsverhalten von Pferden nach Fasergehalten.

Im Allgemeinen sind Pferde als Pflanzenfresser an hohe Fasergehalte angepasst und benötigen diese, um ihre normale Magendarmfunktion aufrecht zu erhalten. Als Dickdarmverdauung können Pferde auch nicht-hydrolysierbare Kohlenhydrate wie Zellulose und Hemizellulose mikrobiell fermentieren und die resultierenden kurzkettigen Fettsäuren energetisch nutzen (COENEN und VERVUERT 2020).

Dennoch werden sehr hohe Gehalte an Säure-Detergenz-Faser (ADF: 35,2-41,5 %) und Säure-Detergenz-Lignin (ADL: 3,8-4,4 %) weniger präferiert als moderate Gehalte (ADF: 28,4-35,7 % ADL: 2,6-3,6 % (CUMMINS et al. 2014, STANIAR et al. 2010). STANIAR et al. (2010) fütterten drei verschiedene Aufwüchse von Zwerghirse-Heu an Pferde und beobachteten die Präferenzen. Dabei wurden die beiden früheren Schnitte dieses Heus sehr gut toleriert, während der spätere Schnitt mit höheren ADF- und ADL-Gehalten (ADF: 41,5 %, ADL: 4,0 %) weniger gerne gefressen wurde (STANIAR et al. 2010).

Die Ergebnisse stimmen mit denen von CUMMINS et al. (2014) überein, die auch Zwerghirse-Heu in unterschiedlichen Wachstumsstufen und Bermudagrass fütterten und die Aufnahme beobachteten. Die Pferde fraßen die Chargen mit erhöhten Neutraler-Detergenz-Faser (NDF: 71,1-73,6 %), ADF (35,2-41,5 %) und ADL (3,8-4,4 %) Gehalten weniger gern als die mit geringeren Gehalten (NDF: 67,6 %, ADF: 28,4 %, ADL: 2,6 %). Es wurde also eine starke negative Korrelation zwischen Faserfraktion und Palatabilität festgestellt (CUMMINS et al. 2014).

2.3.4 Selektion aufgrund von negativen Erfahrungen

PROVENZA et al. (1992) beschrieben eine Selektion von Herbivoren nach post-ingestiven Effekten, sowohl im positiven (förderliche Nährstoffzusammensetzung), als auch im negativen Sinne (Übelkeit). Einige Studien beschreiben ein negatives post-ingestives Verhalten (Übelkeit) bei Wiederkäuern. In diesen Studien konnte durch das Emetikum LiCl eine Nahrungsaversion ausgelöst werden (PROVENZA et al. 1994, PROVENZA und BURRITT 1991, BURRITT und PROVENZA 1989).

HOUPPT et al. (1990) haben in diesem Zusammenhang eine Arbeit zur Nahrungsaversion bei Pferden veröffentlicht. Es wurde Apomorphin als schnell wirksames Emetikum verwendet, um ein Übelkeitsgefühl hervorzurufen. Die Pferde bekamen entweder direkt nach der Futteraufnahme oder mit 30 Minuten Verzögerung intramuskulär 0,06 mg/kg KGW Apomorphin verabreicht. Das Futter wurde erneut vorgelegt und geprüft, ob eine Aversion ausgelöst wurde. Es zeigte sich, dass die Pferde bei sofortiger Gabe von Apomorphin die Futteraufnahme im Folgenden signifikant verringerten, während bei einer Verzögerung von 30 Minuten keine verminderte Aufnahme auftrat (HOUPPT et al. 1990).

Auch PFISTER et al. (2007) konnten in einer Studie zur Locoidose eine Aversionsreaktion von Pferden durch LiCl als Emetikum bei Pferden und Schafen erreichen, indem direkt nach der Futteraufnahme LiCl (190 mg/kg KGW) in Wasser gelöst über eine Nasenschlundsonde eingegeben wurde. So konnte eine Aversion gegen das Testfutter (*Sorghum bicolor*) erzeugt werden (PFISTER et al. 2007).

2.3.5 Selektion nach Geschmack und Geruch

Wie bereits weiter oben besprochen, konnten VAN DEN BERG et al. (2016a) in einer Studie zum Selektionsverhalten von Pferden im Bezug zu höheren Proteingehalten auch eine Präferenz nach Geruch und Geschmack feststellen. Es wurden deutlich höhere Aufnahmen von Futtermitteln festgestellt, die mit nicht-kalorischem Süßungsmitteln (2,25 % Erythritol- bzw.

Stevia-Mixtur) versetzt waren oder wenn ein nicht-kalorischer süßer Geschmacksstoff wie Kokosnuss oder Banane zugesetzt wurde. Hierbei wurde der Nährstoffgehalt als das stärkste Selektionskriterium wahrgenommen, gefolgt vom Geschmack (Süßstoff). Den geringsten Effekt hatte der Geruch (VAN DEN BERG et al. 2016a).

In einer anderen Studie von VAN DEN BERG et al. (2016b) wurde ermittelt, dass Pferde ihren neophobischen Effekt reduzieren können, wenn das neuartige Futtermittel mit einem altbekannten Geruch versetzt wurde.

Zudem testeten RANDALL et al. (1978) verschiedene Geschmäcker im Trinkwasser bei Fohlen. Dazu wurde das Wasser mit salzigen (Natriumchlorid), sauren (Essigsäure), süßen (Sacharose) und bitteren (Quininhydrochlorid) Substanzen versetzt und die Aufnahme überwacht. Ab 5 g/100 ml NaCl wurden die salzigen Substanzen gemieden. Die meisten Fohlen vermieden außerdem Substanzen mit Essigsäuregehalten von mehr als 1,25ml/100ml. Die bittere Substanz wurde bis Konzentrationen von 16-20mg/100ml Quininhydrochlorid toleriert und darüber verweigert. Die Zuckerlösung wurde ähnlich gut wie das Trinkwasser aufgenommen und teilweise sogar präferiert (RANDALL et al. 1978).

2.4 Selektionsverhalten in Bezug auf Jakobs-Kreuzkraut

Einige Autoren erwähnen, dass Jakobs-Kreuzkraut auf der Weide nicht gefressen wird, außer wenn es sich um unerfahrene Jungtiere handelt oder wenn die Pflanze noch im Rosettenstadium ist. Als größere Gefahr wird die Aufnahme von Jakobs-Kreuzkraut in verarbeiteten Futtermitteln beschrieben. Diese wird vor allem darauf zurückgeführt, dass die Toxine während der Trocknung stabil bleiben, die Bitterstoffe jedoch zurück gehen (PETZINGER 2011b, STEGELMEIER 2011, VANDENBROUCKE et al. 2010). Studien zu diesem Thema sind jedoch nicht verfügbar.

HUSSAIN et al. (2018) geben an, dass herbivore Tiere Giftpflanzen aussortieren können, es sei denn es sind folgende Einschränkungen gegeben:

- Geringe oder keine Futterauswahl
- Zugang zu unbekanntem Wiesen
- Hunger
- Einsatz von Herbiziden

MARINIER und ALEXANDER (1991) haben getestet, ob Pferde *Senecio bupleuroides* (heimisch in Afrika) meiden. Dazu wurden einem Pferd eine Handvoll Pflanzen angeboten und die Aufnahme mit einer Zahl von 0-6 beschrieben. Dabei besagte 0, dass die Pflanze nach

Beriechen nicht aufgenommen wurde, und 6, dass die Pflanze ohne Vermeidungsversuche gefressen wurde. Der Test wurde zweimal wiederholt und die Pflanzenreste wurden nach der Aufnahme so gut wie möglich aus dem Maul entfernt, um Intoxikationen zu vermeiden. Der Mittelwert von 10 getesteten Pferden betrug 5,3. Somit war die Mehrzahl der Pferde nicht in der Lage, die Pflanze zuverlässig zu meiden, wenn sie im frischen Zustand und separat gefüttert wurde (MARINIER und ALEXANDER 1991).

2.5 Rechtliche Einordnung

2.5.1 EU-Recht

Im europäischen Recht ist der Umgang mit kontaminierten Futtermitteln zunächst für lebensmittelliefernde Tiere in der Verordnung (EG) 178/2002 Artikel 15 geregelt:

- (1) „Futtermittel, die nicht sicher sind, dürfen nicht in Verkehr gebracht oder an der Lebensmittelgewinnung dienende Tiere verfüttert werden.
- (2) Futtermittel gelten als nicht sicher in Bezug auf den beabsichtigten Verwendungszweck, wenn davon auszugehen ist, dass sie
 - die Gesundheit von Menschen oder Tier beeinträchtigen können;
 - bewirken, dass die Lebensmittel, die aus den der Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren hergestellt werden, als nicht sicher für den Verzehr durch den Menschen anzusehen sind. [...]“

Somit ist die Verfütterung an lebensmittelliefernde Tiere und das Inverkehrbringen von nicht sicheren Futtermitteln, wie beispielsweise mit Jakobs-Kreuzkraut kontaminiertes Heu, verboten. Die Verordnung (EG) 767/2009 erweitert diese Regelung für nicht-lebensmittelliefernde Tiere.

2.5.2 Nationales Recht

Im nationalen Recht ist der Umgang mit kontaminierten Futtermitteln in §17 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs wie folgt geregelt:

„[...] Es ist ferner verboten,

1. Futtermittel
 - a) Für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass sie bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Verwendung geeignet sind, die tierische Gesundheit zu schädigen [...]“

Literaturübersicht

Somit ist auch im nationalen Recht die Herstellung von kontaminierten Futtermitteln, wie mit Jakobs-Kreuzkraut kontaminiertes Heu, verboten.

3 Publikation

3.1 Horses' rejection behaviour towards the presence of *Senecio jacobaea* L. in hay

Sroka L, Müller C, Hass M-L, Aboling S, These A, Vervuert I

BMC Veterinary Research 18, 25 (2022)

Eigene Beiträge zum Manuskript:

- Entwicklung Studiendesign
- Versuchsausführung
- Datenanalyse
- Ausarbeitung des Manuskripts

Beiträge der anderen Autoren:

- Clara Müller: Entwicklung Studiendesign, Versuchsausführung, Datenanalyse
- Marie-Lena Hass: Versuchsausführung
- PD Sabine Aboling: Entwicklung Studiendesign
- Dr. Anja These: Pyrrolizidinalkaloid-Messung und Bearbeitung des Manuskripts
- Prof. Dr. Ingrid Vervuert: Entwicklung Studiendesign, Versuchsausführung, Datenanalyse, Ausarbeitung des Manuskripts

RESEARCH

Open Access



Horses' rejection behaviour towards the presence of *Senecio jacobaea* L. in hay

Louisa Sroka¹, Clara Müller¹, Marie-Lena Hass², Anja These³, Sabine Aboling² and Ingrid Vervuert^{1*}**Abstract**

Background: *Senecio jacobaea* contains pyrrolizidine alkaloids that can induce severe hepatic intoxication in horses, either acute when ingested in high amounts or chronic when consumed over a long period. The aim of this study was to determine horses' rejection behaviour towards the presence of *Senecio jacobaea* in hay when fed ad libitum. We hypothesized that adult horses can sort *Senecio jacobaea* out of the contaminated hay when hay is fed ad libitum. Six warmblood geldings with a mean (\pm SD) age of 15 ± 2 years were included. In a randomized study, *Senecio jacobaea* contaminated hay (5% or 10% contamination level) was provided at several timepoints over the day for 1 hour to six. Hay was provided ad libitum for the rest of the day. The horses' rejection behaviour towards *Senecio jacobaea* was observed. If a horse ingested two *Senecio jacobaea* plants twice at different timepoints, then the horse was excluded from the experiment.

Results: Two out of six horses had to be excluded from the study after three out of 12 observation periods due to repeated *Senecio jacobaea* intake. Two other horses had to be excluded after nine and 11 out of 12 observation periods. Only two horses were able to sort out the various amounts (5 and 10% contamination level) of *Senecio jacobaea* during the whole experiment.

Conclusions: Horses' intake of *Senecio jacobaea* cannot be avoided despite being fed with hay ad libitum. Due to the risk of chronic intoxication by pyrrolizidine alkaloids intake, feeding *Senecio jacobaea* contaminated hay must be avoided, and pastures with *Senecio jacobaea* growth are considered inappropriate for feed production.

Keywords: Selection behaviour, Pyrrolizidine alkaloids, Toxic plants, Ad libitum, Tansy ragwort

Background

Senecio jacobaea L. (SJ, family: *Asteraceae*, genus: *Senecio*, syn. Tansy ragwort) [1, 2] is a toxic plant on humus-enriched, sandy, loam, and clay soils, which can be found worldwide [1, 3, 4]. SJ contains pyrrolizidine alkaloids (PAs), which are secondary plant metabolites [5] that can lead to severe intoxication in horses and other

animals [6]. Acute intoxication by SJ intake is possible but rarely reported in horses. However, the accidental intake of small quantities of SJ over a long period can lead to PA accumulation in liver tissue and may induce severe chronic intoxication such as seneciosis in farm animals [4, 6]. The most common clinical symptoms of chronic PA intoxication include icterus, photodermatitis, neurological deficits, and ataxia [6–9]. In recent years, SJ has increasingly spread due to the following factors: 1) increase in fallow land, 2) increased nitrogen deposition in the air, 3) purpose seeding in roadside greenery, and 4) climate changes such as drought [10]. These factors have led to an increasing plant population on pasture

*Correspondence: ingrid.vervuert@vetmed.uni-leipzig.de

¹ Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022, corrected publication 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

and grassland, which may result in SJ-contaminated hay [1, 10, 11].

After references [4–6] it is described that horses usually avoid SJ probably on pasture due to the bitter taste. In contrary to the rejection behaviour of horses on pasture, the ability to reject SJ in hay is rarely reported in horses. However, the intake of SJ-contaminated hay may be associated with a high health risk especially in combination with restricted forage supply due to hay shortages during the last years [12]. To the best of our knowledge no clinical studies to this topic were performed in horses.

Due to this the study aimed to monitor horses' rejection behaviour (5 and 10% contamination level) in relation to the presence of SJ in hay when provided ad libitum. We hypothesized that adult horses could sort SJ out of the contaminated hay when hay is fed ad libitum.

Results

Health monitoring

Clinical examinations

Five of the six horses did not show any abnormalities during the regular examinations. At day seven of the experiment, one horse showed colic symptoms. After medical colic treatment, the horse recovered within 2 days.

Blood analysis

Selected blood parameters at the beginning and at the end of the study are summarized in Table 1. All blood parameters were within the reference ranges.

Observation periods

Two out of six horses ingested SJ within the first three observation periods and had to be excluded from the experiment. Another two horses showed an inconsistent

rejection behaviour. On some days, the horses ingested stems of variable size, while on other days, the horses were able to sort out SJ independently of the size of the stems. These two horses had to be excluded after nine and 11 observation periods. Two horses were able to reject the various amounts of SJ (5 and 10% contamination level) throughout the whole feeding period (Fig. 1).

Break-offs of the observation periods by ingestion of SJ by the respective horse were evenly distributed over the 60 min (Fig. 2).

Toxin analysis

The total PA content is determined as the sum of individual alkaloids in dry matter (DM). The PA content was highest in dried flowers, followed by leaves. Stems had the lowest content. PA-content in fresh plant material (freeze-dried) was only slightly higher than in dried plant material (Fig. 3).

Crude nutrients and fibre fraction

The results of crude nutrient analyses are summarized in Table 2. The crude protein (CP), crude lipid (CL) and neutral detergent fibre (NDF) content in SJ were significantly lower than in hay. Fibre fraction, acid detergent fibre (ADF), and acid detergent lignin (ADL) levels were significantly higher in SJ than in hay samples.

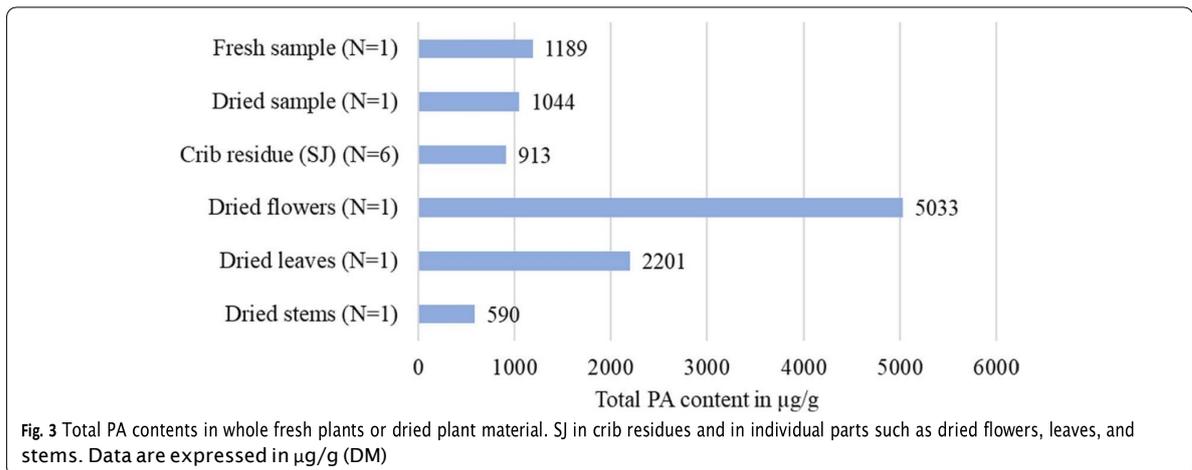
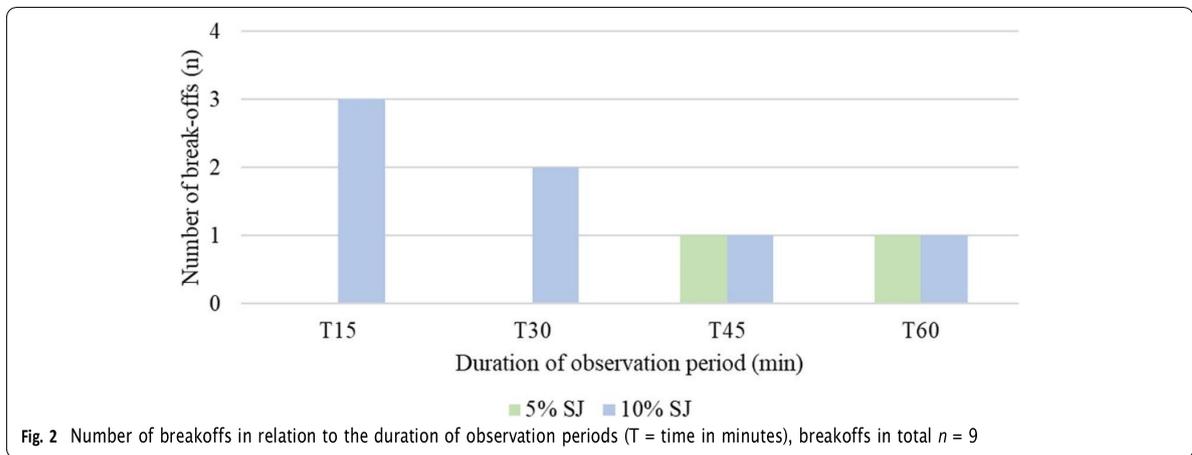
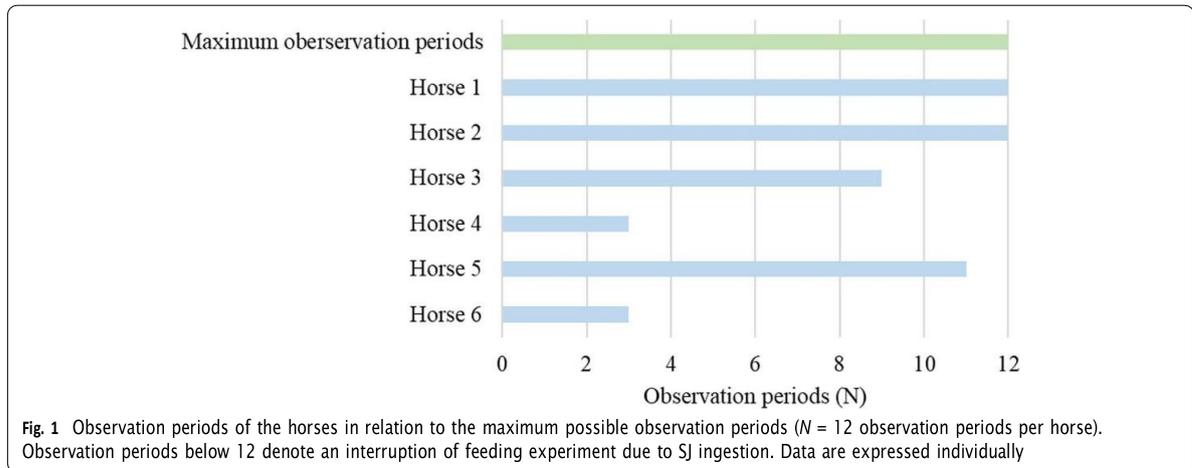
Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study investigating the rejection behaviour of horses towards dried SJ in hay. In this study, horses were fed hay ad libitum. Under these conditions, we hypothesized that horses can sort SJ out of hay; however, the findings of this study only partially confirmed our hypothesis.

Table 1 Blood parameters at the beginning and at the end of the experiment and reference ranges

Blood parameters	Start of the feeding period	End of the feeding period	P-value	Reference parameters [13]
White blood cells (G/L)	6.4 ± 1.27	6.55 ± 0.836	0.701	4.4-12
Total protein (g/L)	66.2 ± 5.98	68.8 ± 5.74	0.015	57.8-78.7
Albumin (g/L)	33 ± 2.1	35.3 ± 1.34	0.025	27.3-37.0
Cholesterol (mmol/L)	2.29 ± 0.347	2.21 ± 0.267	0.326	1.72-2.95
Bilirubin (µmol/L)	22.6 ± 5.87	24.9 ± 1.7	0.355	15.1-47.0
BA (µmol/L)	3.77 ± 0.845	4.98 ± 1.38	0.094	<12
TAG (mmol/L)	0.325 ± 0.056	0.288 ± 0.041	0.272	0.13-0.61
AST (U/L)	369 ± 44.35	367 ± 43.55	0.948	213-627
γGT (U/L)	27.1 ± 7.09	20.55 ± 7.78	0.038	6.39-44.8
GLDH (U/L)	2.02 ± 0.293	2.92 ± 1.79	0.269	1.39-11.41
LDH (U/L)	381 ± 78.8	349 ± 55.7	0.087	224-536

Data are expressed as mean ± SD. BA bile acid, TAG triacylglycerol, AST aspartate aminotransferase, γGT gamma-glutamyl transferase, GLDH glutamate dehydrogenase, LDH lactate dehydrogenase



During the observation periods, four out of the six horses did not reject SJ properly, while only two horses were able to refrain from SJ intake during the whole study.

In the literature, one of the frequently mentioned reasons for a reduced rejection of toxic plants in horses is the lack of adequate daily forage provision [14, 15]. Due to hay provision ad libitum, the lack of satiety was ruled out in this study. Terminations due to SJ uptake were equally distributed over the one-hour observation period. Consequently, the uptake of SJ was not correlated with the remaining hay volume (Fig. 2).

Certain plant species produce secondary metabolites, which can act as defence against uptake [16]. In the case of SJ, mainly PAs and sesquiterpene lactones are mentioned as bitter tasting plant metabolites for horses [17]. Petzinger (2011) described a rejection of SJ by horses on pasture due to the bitter taste of fully grown SJ [6]. How-

Table 2 Crude nutrients, and fibre fraction in hay and SJ

Parameter	Hay (N = 6)	SJ (N = 6)	P-level
	(DM: 90.2 ± 1.53)	(DM: 90.6 ± 1.59)	
CL (%)	1.62 ± 0.414	0.611 ± 0.213	0.002
CP (%)	9.37 ± 1.59	3.50 ± 0.241	0.002
CF (%)	33.7 ± 3.69	38.5 ± 0.964	0.015
NDF (%)	62.8 ± 5.17	57.8 ± 1.89	0.041
ADF (%)	36.3 ± 3.21	45.42 ± 1.74	0.002
ADL (%)	3.8 ± 0.938	5.32 ± 0.311	0.026
NFE (%)	40.0 ± 3.17	43.2 ± 1.78	0.093

Data are expressed as mean ± SD. CF crude fibre, NFE nitrogen-free extract

ever, it is assumed that bitter-tasting plant compounds decrease during the drying process, which may reduce the rejection behaviour in horses [6].

In the present study, PA content in dried SJ was comparable to PA levels in fresh SJ material. Our findings are in accordance with the results obtained by Candrian et al. (1984) and Kaltner et al. (2018) who postulated that PA levels remained stable during the drying process [18, 19]. Unfortunately, other bitter-tasting substances were not measured in the present study. For this reason, an evaluation of a possible rejection criterion based on bitter substances was not possible.

In order to investigate the ability of horses to associate a novel food to illness, Houpt et al. (1990) used apomorphine (0.06 mg/kg body weight [BW]) as a rapid-acting emetic to induce food aversions in horses. Apomorphine was injected intramuscularly, directly after novel food consumption or with a delay of 30 min. Findings implicated that horses were able to develop a food aversion when apomorphine-induced nausea occurred

immediately after feed intake. No food aversion was observed when apomorphine was injected 30 min after food consumption [20].

Taking the study results of Houpt et al. (1990) into account, the development of food aversion in horses might be linked to acute intoxication with SJ. As SJ intoxication usually occurs as a chronic process with the earliest symptoms manifested weeks or even months after ingestion, the development of food aversion due to nausea seems unlikely in horses.

In addition, horses are probably able to reject their food based on macronutrient contents. Van den Berg et al. (2016) observed that horses discriminate feedstuff in relation to nutrient content, odour, and taste. Horses showed a significantly higher intake of protein-rich (14% vs. 27% CP) but isocaloric feeds, when adapted to the diets for at least four or 5 days. In addition, a higher intake of diets combined with a natural non-caloric sweetener (2.25% of erythritol/stevia mixture) and a higher intake of diets fortified with non-caloric sweet odours (food flavour emulsions: coconut/banana) were noted. In the study by van

den Berg et al. (2016) nutrient content was mentioned as the most important criterion for food rejection in horses followed by the food's taste. Odour had the lowest effect on food intake [21]. In another study, van den Berg et al. (2016) stated that a well-known non-nutritive odour like fresh lucerne reduced the neophobic effect in horses when lucerne odour was added to a novel food [22]. Redgate et al. (2014) tested the preference of horses according to proteins, lipids, and hydrolysable carbohydrates in isocaloric feed. Horses showed a significantly higher preference to a protein-rich diet (CP: 11.6%) and hydrolysable carbohydrate-rich diet (HCO-H: 13.9%) than to fat-enriched rations (CL: 4.3%) after an adaptation phase to each ration fed separately for 3 days [23]. Cairns et al. (2002) investigated the preference for high-energy feedstuff in horses. First, they showed a preference for mint flavour in contrast to garlic flavour in isocaloric rations. Afterwards, a low-energy diet (digestible energy (DE): 9.3 MJ/kg) and a high-energy diet (DE 11.3 MJ/kg) were mixed with each flavour, and the preference was tested. High-energy feedstuff was preferred even when paired with the less palatable garlic flavour after an adaptation period of 10 meals [24].

Furthermore, the findings of the studies previously mentioned demonstrated that horses had a greater preference for familiar diets and that horses showed a strong neophobic response towards unfamiliar diets. A discrimination based on macronutrient content required an adaptation period for at least three meals [21, 23, 24].

In our study, CP and CL levels in SJ were significantly lower than in hay samples. However, we speculated that macronutrient content seemed unlikely to regulate feed

intake behaviour as two out of six horses ingested SJ within the first three observation periods.

Besides the rejection behaviour based on taste, odour, or nausea, horses also select their food for structure. As herbivores, horses are highly specialized to consume feedstuffs with high levels of structural substances such as ADF, NDF and ADL [15].

Stainair et al. (2010) monitored the preference of horses for three maturity stages of teff hay. They observed that horses showed a higher preference for earlier headings with a lower NDF and ADF content [25]. Cummins et al. (2014) tested preferences of horses in different maturities and growth under different weather conditions in teff hay and Bermuda grass [26]. Both studies showed that horses did accept hay with higher percentages of ADF, NDF, and ADL such as teff hay. However, they also indicated a strong negative correlation between fibre content (ADF/NDF/ADL) and palatability (ADF: 35.2–41.5%; NDF: 71.1–73.6%; ADL: 3.8–4.4%) [25, 26].

In the present study, fibre fractions such as ADF and ADL were significantly higher in SJ than in the hay samples. However, the ADF content in hay and SJ were found to be lower than that in the study of Staniar et al. (2010) and Cummins et al. (2014) [25, 26]. In contrast, the ADL content in SJ exceeded the ADL content as described by Cummins et al. (2014). An elevated lignin content may have caused the rejection of SJ in two horses but did not explain the intake of SJ in the other four horses.

Another possible explanation for the different SJ sorting behaviour of horses is learned rejection behaviour as a foal. Bolzan et al. (2020) observed that foals learned their rejection behaviour in three steps: 1) explorative phase: the foals tested different plants in small quantities; 2) specialization phase: diversity of plants ingested by the foal decreased and plant intake approached to the feeding behaviour of the mare; 3) stabilization phase: feed intake no longer differed significantly from the dam [27]. In our study, two horses rejected the intake of SJ throughout the whole feeding period. It is possible that these horses had contact with SJ during foalhood.

Limited data is available on the toxic level of SJ in horses. Craig et al. (1991) fed SJ to 12 ponies until lethal intoxication. In the study of Craig et al. (1991) the mean daily intake of PA ranged between 0.79 and 1.7 mg/kg BW. Lethal intoxication occurred between 49 and 406 days after first SJ intake [28]. With respect to the study of Craig et al. (1991) the PA content of SJ used in our study would correspond to an average intake of 454–976 g of the dried SJ material in an adult warmblood horse. Mendel et al. (1988) fed *Senecio vulgaris* cubes, with an average of 233 ± 9.2 mg PA/kg BW, to nine horses over a feeding period of 89–159 days until lethal intoxication [29]. The

PA intake by Mendel et al. (1988) corresponded to an estimated daily intake of 1.08 kg dried SJ in our study.

Petzinger (2011) reviewed a tolerable daily intake (TDI) of 1 µg PA/kg BW [6]. The TDI by Petzinger (2011) corresponded to 0.57 g of dried SJ plant material intake per day for a horse (600 kg BW).

Furthermore, a no-observed-adverse-effect level was determined for the PA riddelliine in rats, concerning non-neoplastic chronic effects [30]. Using a safety factor of 100, a guidance value derived for non-neoplastic chronic effects of 0.1 µg PA/kg BW per day can be calculated for horses.

Under the premise that horses ingest daily amounts of hay equivalent to 2% of their BW, a 5% contamination for a 600 kg horse may result in an intake of 626.9 mg PA/d. A 10% contamination would lead to an intake of 1252.8 mg PA/d. Both intake amounts exceed the proposed guidance value of 0.1 µg PA/kg BW more than 10,000-fold.

The European Union regulates the handling of contaminated hay as follows. According to regulation (EC) No. 178/2002: '[...] feed shall not be placed on the market or fed to any food-producing animal if it is unsafe [...]'. Feed shall be deemed to be unsafe [...] if it is considered to have an adverse effect on human or animal health [...]'. Therefore, SJ-contaminated hay should not be placed on the market or fed to food-producing animals. Moreover, regulation (EC) No. 767/2009 complements non-food producing animals: '[...] requirements set out in Article 16 of Regulation (EC) No 178/2002 shall apply, mutatis mutandis, to feed for non-food producing animals [...]'].

Conclusions

Two out of six horses were not able to sort SJ out of hay. Two other horses showed an inconsistent rejection behaviour. Only two out of six horses were able to pick out the various amounts of SJ from hay throughout the whole feeding period. The findings of this study showed that the SJ rejection behaviour of horses differs individually. Overall, it is doubtful that horses can completely avoid SJ intake due to rejection, even when hay is offered ad libitum. As even a low level of SJ contamination may lead to chronic intoxication in horses when consumed over a longer period, SJ levels in feed should be generally reduced to the lowest level reasonably achievable (ALARA principle), which is also common practice in the human food sector. Consequently, pastures with SJ plant growth are not appropriate for feed production.

Methods

Animals

Six clinically healthy warmblood geldings with a mean (\pm SD) age of 15 years (\pm 2 years) and an average (\pm SD) body mass (BW) of 674 kg (\pm 85 kg), owned by the

Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics were housed in individual boxes with straw bedding. Hay was offered ad libitum. Additionally, 50 g of commercial mineral feed was supplemented (Reformin Plus®, Höveler, Münster Germany). Tap water was available at all times. Horses had access to a sand paddock 5 hours daily without any hay provision. All horses were well adapted to the general experimental procedure (general handling by LS and CM, housing and feeding management and video recordings during day and night times).

Feedstuff

The SJ-contaminated hay was harvested in June 2019 from extensively used meadows in Lower Saxony, Germany. SJ was separated from the hay. Hay without any SJ contamination was harvested in Saxony in June 2019. This hay batch was used for preparation and feeding of hay with defined SJ contamination levels.

Preliminary work

In order to determine the individual hay intake within 1 hour for the observation period, horses were provided 1 kg of non-contaminated hay. If the hay intake of the individual horse was more than 1 kg per hour, 0.5 kg of hay was added to ensure sufficient hay supply, providing a greater rejection likelihood between hay and SJ (Table 3).

Observation period

In this randomized experimental study, the day was divided into six subperiods, wherein each horse was provided a defined amount of SJ-contaminated hay (5% or 10% contamination level). Initially, total study was planned for 48 days, but time period was shortened to 34 days due to the exclusion of horses because of repeated SJ intake (Fig. 4).

SJ was weighed and mixed with the corresponding amount of hay by the same person (Table 3). The SJ-contaminated hay was provided over 1 hour. During the one-hour observation period, horses were observed individually by one or two familiar persons (LS and/or CM). Selected observation periods were additionally recorded by video (Camera: FDR-AX 53, Sony Europe B.V.) by one familiar person (LS or CM) standing next to the feed bucket. Daylight was used for the observation periods during the day. Night time observations were carried out by turning on artificial light. Horses were adapted to this procedure at least 2 weeks before starting with the observation periods.

In the case wherein two stems of SJ were ingested, the experiment was terminated and repeated at another day with at least 2 days of lag in the respective horse. After

a second intake of two SJ plants, the horse was excluded from the study.

During the whole feeding experiment, feed residues were removed; hay and SJ were separated, weighed again, and stored for analysis of crude nutrients, fibre fractions and PA-content.

Non-contaminated hay was provided from the same batch during the whole study. Quantity and quality (absence of toxic plants) of non-contaminated hay intake was controlled by weighing and visual controlling.

Health monitoring

A routine health check, including heart and respiratory rate, rectal temperature, auscultation of the stomach, limb pulsation, colour of mucus membrane and conjunctiva, and alterations of the skin, was performed before and every two to 3 days during the experiment.

Blood sampling

Blood samples, through single puncture of the external jugular vein, were taken at the beginning and the end of the study. Blood samples were collected in tubes containing either coagulation activator, lithium-heparin or K2EDTA (Monovette, Sarstedt AG, Nuembrecht, Germany) and analysis was performed within 1 hour after sampling.

Analysis

Blood

Serum liver parameters [albumin, total protein, triacylglycerol (TAG), cholesterol, lactate dehydrogenase (LDH), glutamate dehydrogenase (GLDH), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), and bile acid (BA)] were measured using an automated chemistry analyser (Roche Cobas C311, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Additionally, white blood cells were counted using ADVIA 120 (Siemens Healthineers, Erlangen Germany).

Hay

Hay samples ($N = 6$) were taken and analysed for crude nutrients and fibre fractions.

Table 3 Amount of hay (kg) and SJ quantity (g) per horse for the one-hour observation period

Horse	Amount of hay	SJ 5%	SJ 10%
1, 2, 5, and 6	1.5	75	150
3 and 4	1	50	100

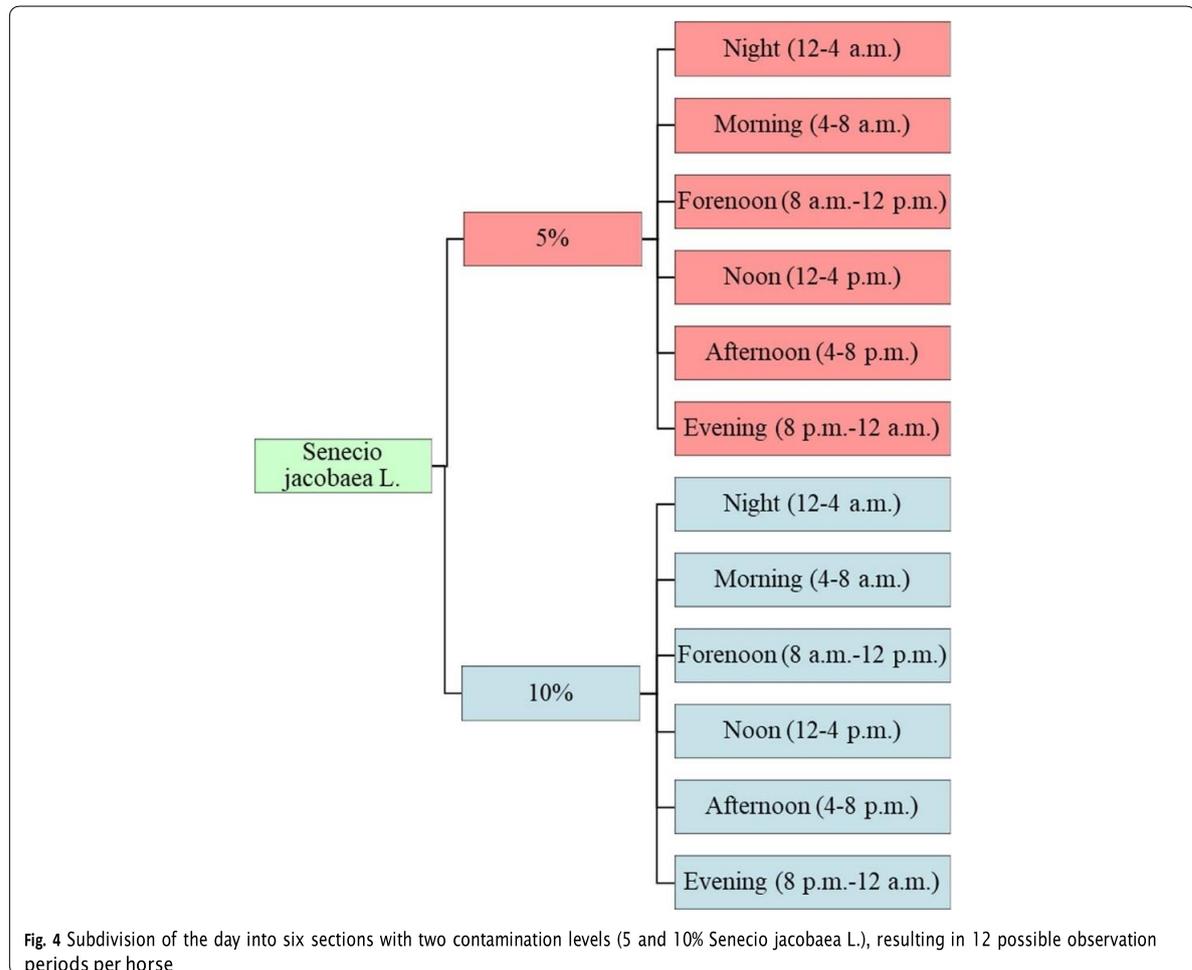


Fig. 4 Subdivision of the day into six sections with two contamination levels (5 and 10% *Senecio jacobaea* L.), resulting in 12 possible observation periods per horse

DM was determined after oven-drying (103 °C) to constant mass. Crude nutrients such as CP and CL were assayed by the Weende system (Naumann and Bassler, 2004) [31]. Crude fibre (CF), NDF, ADF, and ADL were analysed by ANKOM® (Ankom Technology, Madison, USA) according to Van Soest et al. (1991) [32]. The nitrogen-free extract (NFE) content was calculated ($NFE = DM - (CP + CL + CA + CF)$).

Senecio jacobaea L.

In order to determine crude nutrients and fibre fractions, Weende analysis was performed in randomly collected samples ($N = 6$) of SJ using the methods described previously.

PAs were analysed in the following SJ samples: fresh plant ($n = 1$), dried plant ($n = 1$), SJ sorted out of crib residues of each horse ($n = 6$), and one sample of dried

stems ($n = 1$), flowers ($n = 1$), and leaves ($n = 1$) each. All samples were a mix of various plants. PAs were analysed using liquid chromatography with tandem mass spectrometry by the National Reference Laboratory for Mycotoxins and Plant Toxins, Berlin. The total PA content was calculated as a sum of the following retronecine-type PAs: erucifoline, jacobine, jacoline, retrorsine, riddelline, senecionine, seneciphylline, and jaconine including all their corresponding *N*-oxides as well as their naturally occurring isomers and the otonecine-type PA senkirkine.

Sample preparation

For the extraction of PAs, 10.0 g \pm 0.1 g of comminuted dried plant material was weighed into a centrifuge tube. A duplicate extraction with a volume of 100 mL aqueous extraction solution containing 0.05 M H_2SO_4 was used. For extraction, an ultrasonic bath was used for 15 min,

followed by 20 min shaking (overhead shaker). The samples were centrifuged (20 °C, 3800 g, 10 min), the supernatant was passed through a 0.20 µm nylon membrane filter, 20–/50–/100-fold diluted, and subsequently analysed by an external calibration applying a 10-point calibration curve in the range of 0.05–150 ng/mL.

Liquid chromatographic analysis

All measurements were conducted on an Agilent 1290 Infinity Series UHPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Chromatographic reversed-phase separation with 2 µL injection volume was performed on a C18 Hypersil Gold column (150 mm × 2.1 mm; 1.9 µm particle size) with guard column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at a flow rate of 0.3 mL/min and with a column temperature of 40 °C. The binary mobile phase was composed of water as mobile phase A and methanol as mobile phase B, both containing 0.1% formic acid and 5 mmol ammonium formate. The gradient conditions were as follows: 0–0.5 min A: 95%/B: 5%; 7.0 min A: 50%/B: 50%; 7.5 min A: 20%/B: 80%; 7.6 min A: 0%/B: 100%; 10.1–15 min A: 95%/B: 5%.

Tandem mass spectrometry

Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) data were acquired in the positive ionization mode on a QTRAP 6500 MS/MS system (Sciex, Agilent Technologies, Santa Clara USA). The settings of the ESI source were as follows: source temperature 500 °C, curtain gas 35 psi, ion source gas 1 (sheath gas) 60 psi, ion source gas 2 (drying gas) 60 psi, ion-spray voltage +5500 V and collision gas (nitrogen) medium.

Two MRM transitions were measured per analyte as follows ([M + H]⁺ underlined, quantifier bold, qualifier plain): Er (350 → 120/2138); ErN (366 → 120/136); Jb (352 → 120/155); JbN (368 → 296/120); JI (370 → 120/138); JIN (386 → 120/136); Jn (388 → 138/156); JnN (404 → 118/120); Re (352 → 120/138); ReN (368 → 120/118); Rd (350 → 120/138); RdN (366 → 136/120); St (370 → 120/138); StN (386 → 120/136); Sc (336 → 120/138); ScN (352 → 118/136); Sp (334 → 120/138); SpN (350 → 118/136); Sk (366 → 150/168).

Data analysis

Descriptive statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2016[®] (Microsoft Corporation, Redmond, USA) and SPSS 27[®] (IBM, Armonk, USA). All parameters were tested on normal distribution with SPSS 27[®]. A paired t-test of normally distributed data was performed to compare blood parameters before and after the feeding period. Crude nutrients and fibre

fractions were not normally distributed. These data were analysed by a Mann-Whitney U test for unpaired samples to compare hay and SJ samples. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Due to the low number of animals and feedstuff, sample size data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

Abbreviations

ADF: Acid detergent fibre; ADL: Acid detergent lignin; LDH: Lipid dehydrogenase; AST: Aspartate aminotransferase; BA: Bile acid; BW: Bodyweight; CF: Crude fibre; CLs: Crude lipids; CP: Crude protein; DE: Digestible energy; DM: Dry matter; ESI-MS: Electrospray ionization tandem mass spectrometry; GGT: Gamma-glutamyl transferase; GLDH: Glutamate dehydrogenase; NDF: Neutral detergent fibre; PA: Pyrrolizidine alkaloids; SD: Standard deviation; SJ: *Senecio jacobaea* L.; TAG: Triacylglycerol.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to J. Tietke and B. Ladányi for their laboratory work and Michael Wacker and Sabine Klemann for their care of the horses. The authors also acknowledge L. Wahl, J. Starzonek, and E. Theiner for their help in the *Senecio jacobaea* L. plant selection and sampling.

ARRIVE guidelines

The study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Consent to publish

Not applicable.

Authors' contributions

L. Sroka contributed to study design, study execution, data analysis and preparation of the manuscript. C. Müller contributed to study design, study execution and data analysis. L.-M. Hass contributed to the delivery of hay and plant sampling. S. Aboling addressed and suggested the topic and contributed to study design. A. These contributed to PA data measurement and contributed to preparation of the manuscript. I. Vervuert contributed to study design, study execution, data analysis and preparation of the manuscript. All authors gave their final approval of the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. The German Federal Environmental Foundation (Deutsche Bundesstiftung Umwelt), Osnabrück, AZ: 34275/0. The funding did not play a role in the design, analysis or reporting of the study.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The project was approved by the Ethics Committee for Animal Rights Protection of the Leipzig District Government (No. TVV 17/19) in accordance with German legislation for animal rights and welfare. The horses were owned by the Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics under the responsibility of Ingrid Vervuert (corresponding author).

Consent for publication

All authors gave their final approval of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared no competing interests.

Author details

¹Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, Leipzig, Germany. ²Institute for Animal

Nutrition, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany.
³Department Safety in the Food Chain, German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany.

Received: 16 June 2021 Accepted: 20 December 2021
 Published online: 07 January 2022

References

- Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen. Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobea*): Eine Giftpflanze auf dem Vormarsch. Münster: Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen; 2011.
- Cortinovis C, Caloni F. Epidemiology of intoxication of domestic animals by plants in Europe. *Vet J*. 2013;197:163–8.
- Thüringer Landesamt für Vermessung und Geoinformation, editor. Wichtige Giftpflanzen des Grünlandes. Jena; 2014.
- Stegelmeier BL. Pyrrolizidine alkaloid-containing toxic plants (*Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Heliotropium*, and *Echium* spp.). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2011;27:419–28.
- Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011;28:282–92.
- Petzinger E. Pyrrolizidinalkaloide und die Seneciose bei Tieren: Teil 2: Klinik, Speziesunterschiede, Rückstandsverhalten, Futtermittelkontamination und Grenzwerte. *Tierärztl Prax*. 2011;39:363–72.
- Giles CJ. Outbreak of ragwort (*Senecio jacobea*) poisoning in horses. *Equine Vet J*. 1983;15:248–50.
- Anadón A, Martínez-Larranga MR, Ares I, Martínez M. Poisonous plants of the Europe. In: Gupta RC, editor. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Amsterdam: Academic; 2018. p. 891–910.
- Panther KE, Welch KD, Gardner DR, Lee ST, Green BT, Pfister JA, et al. Poisonous plants in the United States. In: Gupta RC, editor. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Amsterdam: Academic; 2018. p. 837–91.
- Lütt S, Huckauf A. Biologie. In: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen. 4th ed; 2017. p. 7–17.
- Metzing D, Garve E, Matzke-Hajek G, Adler J, Bleeker W, Breunig T, et al. Rote Liste und Gesamtartenliste der Farn und Blütenpflanzen Deutschlands. In: Aktuelle Bewertung der roten Liste. Bonn-Bad Godesberg: Bundesamt für Naturschutz; 2018. p. 7–13.
- Vervuert I. Raufutterversorgung bei Pferden in Zeiten knapper Heu- bzw. Heulagevorräte: Maßnahmen für die Praxis. *Tierärztl Umschau*. 2020;75:88–91.
- Köller G, Gieseler T, Schusser GF. Hematology and serum biochemistry reference ranges of horses of different breeds and age measured with newest clinicopathological methods. *Pferdeheilkunde*. 2014;30:381–93.
- Hussain SM, Herling VR, Rodrigues PHM, Naz I, Khan H, Khan MT. Mini review on photosensitization by plants in grazing herbivores. *Trop Anim Health Prod*. 2018;50:925–35.
- Coenen M, Vervuert I. *Pferdefütterung*. 6th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020.
- Wink M. Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassungen der Pflanzenfresser. Tagungsband VDBiol, 41–58. Tagungsband VDBiol. 1992:130–56.
- Aboling S, Vervuert I. Nutztiergefährdung. In: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen. 4th ed; 2017. p. 33–5.
- Candrian U, Luethy J, Schmid P, Schlatter C, Gallasz E. Stability of pyrrolizidine alkaloids in hay and silage. *J Agric Food Chem*. 1884;32:935–7.
- Kaltner F, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Influence of storage on the stability of toxic pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in peppermint tea, hay, and honey. *J Agric Food Chem*. 2018;66:5221–8.
- Houpt KA, Zahorik DM, Swartzman-Andert JA. Taste aversion learning in horses. *J Anim Sci*. 1990;68:2340. <https://doi.org/10.2527/1990.6882340x>
- van den Berg M, Giagos V, Lee C, Brown WY, Cawdell-Smith AJ, Hinch GN. The influence of odour, taste and nutrients on feeding behaviour and food preferences in horses. *Appl Anim. Behav Sci*. 2016;184:41–50.
- van den Berg M, Giagos V, Lee C, Brown WY, Hinch GN. Acceptance of novel food by horses: the influence of food cues and nutrient composition. *Appl Anim. Behav Sci*. 2016;183:59–67.
- Redgate SE, Cooper JJ, Hall S, Eady P, Harris PA. Dietary experience modifies horses' feeding behavior and selection patterns of three macronutrient rich diets. *J Anim Sci*. 2014;92:1524–30.
- Cairns MC, Cooper JJ, Davidson HP, Mills DS. Association in horses of orosensory characteristics of foods with their post-ingestive consequences. *Anim Sci*. 2002;75:257–65.
- Staniar WB, Bussard JR, Repard NM, Hall MH, Burk AO. Voluntary intake and digestibility of teff hay fed to horses. *J Anim Sci*. 2010;88:3296–303.
- Cummins R. Palatability of teff grass by horses. *Anim Sci Undergrad Honors Theses*. 2014;4:44–9. <http://scholarworks.uark.edu/ansuht/4>.
- Bolzan AMS, Bonnet OJF, Wallau MO, Basso C, Neves AP, Carvalho PCF. Foraging behavior development of foals in natural grassland. *Rangel Ecol Manag*. 2020;73:243–51.
- Craig AM, Pearson EG, Meyer C, Schmitz JA. Clinicopathologic studies of tansy ragwort toxicosis in ponies: sequential serum and histopathological changes. *J Equine Vet Sci*. 1991;11:261–71.
- Mendel VE, Witt MR, Gitchell BS, Gribble DN, Rogers QR, Segall HJ, et al. Pyrrolizidine alkaloid-induced liver disease in horses: an early diagnosis. *Am J Vet Res*. 1988;49:572–8.
- National Toxicology Program. Toxicological Report of the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). 2003.
- Naumann C, Bassler R. *Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik: (Methodenbuch)*. 3rd ed. Darmstadt: VDLUFA-Verl; 2004.
- Van Soest PJJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 1991;74:3583–97.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4 Diskussion

In dieser Studie wurde das Selektionsverhalten von Pferden in Bezug auf Jakobs-Kreuzkraut untersucht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pferde unter ad libitum Heufütterung in der Lage sind Jakobs-Kreuzkraut aus dem Heu zu selektieren.

Diese Hypothese konnte nur teilweise bestätigt werden. Nur zwei Pferde konnten die Jakobs-Kreuzkrautpflanzen zuverlässig, in den verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten meiden, während die restlichen vier Pferde immer wieder Pflanzenteile aufnahmen und aus dem Versuch ausgeschlossen werden mussten.

Im Allgemeinen werden Pferde als selektive Fresser beschrieben. Häufig wird angegeben, dass Pferde unter ad libitum Bedingungen toxische Pflanzen meiden (HUSSAIN et al. 2018, PETZINGER 2011b). Gründe für ein reduziertes Selektionsverhalten in Bezug auf Giftpflanzen sind vielfach Futterknappheit und damit einhergehende Hungergefühle, welche in diesem Versuch durch die ad libitum Heufütterung ausgeschlossen wurden (COENEN und VERVUERT 2020, HUSSAIN et al. 2018). Die Jakobs-Kreuzkraut Aufnahme erfolgte in dieser Studie gleichmäßig über die 60-minütige Beobachtungsperiode. Somit war das Selektionsverhalten unabhängig von der verbleibenden Heumenge im Trog. Ein weiterer genannter Grund für ein potenziell reduziertes Selektionsverhalten von Jakobs-Kreuzkraut durch Pferde im Heu ist eine Abnahme von Bitterstoffen im Pflanzenmaterial während der Trocknung (PETZINGER 2011b).

Viele Pflanzen bilden sekundäre Pflanzenstoffe mit antipastoralen Eigenschaften, wie z. B. Bitterstoffe (WINK 1992). Für einen bitteren Geschmack im Jakobs-Kreuzkraut werden zum einen die PA und zum anderen Sesquiterpenlactone verantwortlich gemacht (ABOLING und VERVUERT 2017). Die im Jakobs-Kreuzkraut gemessenen PA in dieser Studie unterschieden sich im frischen und getrockneten Zustand kaum voneinander. Die konstanten Gehalte im frischen und getrockneten Jakobs-Kreuzkraut stimmen somit mit denen von CANDRIAN et al. (1984) und KALTNER et al. (2018) überein. Sesquiterpenlactone sowie mögliche unbekannte Bitterstoffe wurden in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Bittere Substanzen müssen allerdings nicht zwangsläufig zu einer Selektion von Pflanzen führen (WÖLFLE und SCHEMPP 2018). Um zu testen, ob und in welchen Mengen Pferde unterschiedliche Geschmacksqualitäten vermeiden oder bevorzugen, haben RANDALL et al. (1978) Wasser mit unterschiedlichen Geschmacksrichtungen (sauer, salzig, bitter, süß) versetzt und die Aufnahme bei Fohlen beobachtet. Die Fohlen nahmen bittere Substanzen in geringen

Diskussion

Mengen (0,016-0,02 % Chininhydrochlorid) auf, während das Wasser mit höheren Mengen Chininhydrochlorid (0,02-0,08 %) gemieden wurde. GOODWIN et al. (2005) testeten verschiedene Geschmacksqualitäten in Pellets bei Pferden und stellten fest, dass Bockshornklee trotz seines leicht bitteren Geschmacks eine der bevorzugten Geschmacksrichtungen war. Somit scheinen einige leicht bittere Substanzen von Pferden gut toleriert oder sogar bevorzugt zu werden.

Eine abschließende Bewertung, ob die reduzierte Selektion im Heu mit dem Verlust von bitterem Geschmack zusammenhängt, ist aufgrund der fehlenden Analyse weiterer Bitterstoffe im Rahmen dieser Studie nicht möglich.

Nach PROVENZA et al. (1992) ist eine Selektion von bestimmten Pflanzen aufgrund von schlechten Erfahrungen (Übelkeit) bei herbivoren Tieren möglich. Ob eine Nahrungsaversion bei Pferden durch Übelkeit ausgelöst werden kann, testeten HOUPPT et al. (1990). Den Pferden wurde ein neuartiges Futtermittel vorgelegt und direkt nach der Aufnahme oder mit 30 Minuten Verzögerung Apomorphin (0,06 mg/kg KGW), als schnell wirkendes Emetikum, intramuskulär appliziert. Es stellte sich heraus, dass die Pferde eine Nahrungsaversion entwickelten, wenn die Apomorphingabe direkt nach der Futteraufnahme erfolgte. Bei einer Verzögerung der Apomorphingabe von 30 Minuten nach der Futteraufnahme wurde keine Aversion ausgelöst (HOUPPT et al. 1990).

In dieser Studie kann ein erlerntes Selektionsverhalten aufgrund von negativen Erfahrungen (Übelkeit) sowohl vor, als auch während der Studie diskutiert werden. Falls die Pferde vor dem Versuch bereits Kontakt zu Jakobs-Kreuzkraut gehabt hätten, wäre ein erlerntes Verhalten aufgrund von schlechten Erfahrungen (Übelkeit) zwar theoretisch möglich, aber aufgrund des meist chronischen Verlaufs von Jakobs-Kreuzkraut-Intoxikationen unwahrscheinlich. Ein Lernverhalten aufgrund von Übelkeit während der Studie konnte durch die geringen Mengen aufgenommen Jakobs-Kreuzkrauts (< 4 Stängel), die regelmäßigen klinischen Untersuchungen und die Kontrolle der Blutparameter ausgeschlossen werden.

Als weiteres Selektionskriterium nach PROVENZA et al. (1992) gilt das Vermeiden oder Bevorzugen einer Pflanze aufgrund ihrer Rohnährstoffe. In verschiedenen Studien zum Selektionsverhalten bei Pferden konnte gezeigt werden, dass Pferde Rationen mit einem hohen Proteingehalt (XP: 11,7-27 %) sowie einem hohen Gehalt an hydrolysierbaren Kohlehydraten (HCO-H: 13,9 %) bevorzugt aufnahmen, während Rationen mit einem hohen Lipidgehalt (XL: 4,3 %) zu einer geringeren Aufnahme führten. Für die Selektion nach Rohnährstoffen war eine Adaptationszeit von mindestens drei Mahlzeiten nötig. Außerdem wurden Rationen

Diskussion

präferiert, die entweder mit einem nicht-kalorischen Süßstoff (2,25 % Erythritol-Stevia Mixtur), mit einem nicht-kalorischen süßen Geruch (Banane/Kokosnuss) oder mit einem bekannten Geruch (frische Luzerne) versetzt waren (VAN DEN BERG et al. 2016a, VAN DEN BERG et al. 2016b, REDGATE et al. 2014, CAIRNS et al. 2002).

In der vorliegenden Studie waren die Protein- und Lipidgehalte im Jakobs-Kreuzkraut signifikant geringer als in den Heuproben. Somit erschien Jakobs-Kreuzkraut als eine potenziell weniger schmackhafte Pflanze als das umliegende Heu. Aufgrund der strengen Abbruchkriterien in diesem Experiment wurde die Pferde jedoch nach einer zweimaligen Jakobs-Kreuzkrautaufnahme aus dem Versuch ausgeschlossen. Dadurch wurde die Adaptationsperiode von mindestens drei Mahlzeiten, die in den Studien von VAN DEN BERG et al. (2016a), VAN DEN BERG (2016b), REDGATE et al. (2014) und CAIRNS et al. (2002) genannt wurde, nicht erreicht. Ob sich das Selektionsverhalten nach einer längeren Adaptationsperiode verändert hätte, ist aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht beurteilbar.

Zusätzlich kann auch die Struktur des Futtermittels Einfluss auf die Selektion der Pferde haben. Als Pflanzenfresser sind Pferde darauf spezialisiert, Futtermittel mit hohen Fasergehalten aufzunehmen (COENEN und VERVUERT 2020). Zwei Studien zeigten, dass Zwerghirse-Heu von früheren Schnitzeitpunkten und einem geringeren Rohfasergehalt (ADF: 28,4-35,7 % ADL: 2,6-3,6 %) präferiert gefressen wurden, während die Schnitte mit höheren ADF- und Ligningehalten (ADF: 35,2-41,5 %, ADL: 3,8-4,4 %) weniger gerne aufgenommen wurden (CUMMINS et al. 2014, STANIAR et al. 2010).

In der vorliegenden Studie waren die Fasergehalte (ADF und ADL) im Jakobs-Kreuzkraut signifikant höher als in den Heuproben, wobei der ADF-Gehalt trotzdem nicht die von CUMMINS et al. (2014) und STANIAR et al. (2010) angegebenen ADF-Gehalte erreichte. Der Ligningehalt überschritt jedoch den von CUMMINS et al. (2014) genannten. Somit ist eine Selektion aufgrund einer erhöhten Lignifizierung des Jakobs-Kreuzkrauts denkbar. Ob auch bei den Rohfasergehalten, ähnlich zu den Protein- und Lipidgehalten, eine Adaptationszeit das Selektionsverhalten geändert hätte, ist unklar. Ebenfalls denkbar wäre eine individuelle Präferenz der Pferde für unterschiedliche Geschmacksrichtungen oder Strukturen der Futtermittel. Dies würde das unterschiedliche Selektionsverhalten der sechs Pferde während dieses Experiments erklären.

Nach PROVENZA et al. (1992) lernen herbivore Tiere im Jungtieralter das Selektionsverhalten sowohl von ihrer Mutter als auch von Artgenossen. BOLZAN et al. (2020) fanden heraus, dass

Diskussion

Fohlen innerhalb der ersten 130 Lebenstage zunächst verschiedene Pflanzen, in kleineren Mengen testen und mit der Zeit das Fressverhalten der Mutterstute übernehmen.

In unserem Experiment sortierten zwei Pferde das Jakobs-Kreuzkraut zuverlässig in den unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus. Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass diese beiden Pferde im Fohlenalter Kontakt zu Jakobs-Kreuzkraut hatten und die Selektion von ihrer Mutter und den Artgenossen gelernt haben. Demzufolge müssten die vier Pferde, die Jakobs-Kreuzkraut aufnahmen, keinen Kontakt zu Jakobs-Kreuzkraut im Fohlenalter gehabt haben.

Über die für Pferde toxische Menge von Jakobs-Kreuzkraut ist wenig bekannt. In älteren Studien wurden Pferde mit höheren Mengen PA-haltiger Pflanzen gefüttert und eine Hepatotoxizität nachgewiesen. CRAIG et al. (1991) fütterten acht Ponys mit Jakobs-Kreuzkraut bis zum Versterben der Tiere. Die tägliche PA-Aufnahme lag im Durchschnitt bei 0,79-1,7mg/kg KGW und die Pferde starben nach 49-406 Tagen nach der ersten Jakobs-Kreuzkraut-Aufnahme. Wenn man die PA-Gehalte aus unserer Studie in Bezug setzt, müsste ein 600 kg schweres Pferd täglich 454-976 g getrocknetes Jakobs-Kreuzkraut aufnehmen, um eine tödliche Intoxikation zu erleiden. MENDEL et al. (1988) fütterten neun Pferde mit gemeinem Kreuzkraut (*S. vulgaris* L.) über 89-159 Tage mit durchschnittlich $233 \pm 9,2$ mg PA/kg KGW. Alle Pferde starben an einer tödlichen Vergiftung. Der PA-Gehalt korrespondiert mit ca. 1,08 kg getrocknetem Jakobs-Kreuzkraut aus unserer Studie täglich, für ein 600 kg schweres Pferd. Ob jedoch geringere Mengen Jakobs-Kreuzkraut zu Intoxikationen führen, wurde in diesen beiden Studien nicht getestet.

Zusätzlich zu den Intoxikationsstudien gibt es Grenzwerte für den Menschen, die durch Studien mit dem PA Riddelliin an Ratten ermittelt wurden. Aus diesen Grenzwerten hat PETZINGER (2011b) einen Tolerable Daily Intake (TDI) für Pferde von 1 µg PA/kg KGW festgelegt, welcher einer Menge von 0,57g des Jakobs-Kreuzkraut-Materials aus unserer Studie entspricht. Des Weiteren ist im NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (2003) ein NOAEL von 0,01 mg PA/kg KGW für Menschen angegeben. Daraus kann mit Hilfe eines Sicherheitsfaktors von 100 ein NOAEL für Pferde von 0,1 µg PA/kg KGW ermittelt werden.

Wenn man davon ausgeht, dass ein 600 kg schweres Pferd 2% seiner Körpermasse an Heu pro Tag aufnimmt, würde eine 5%-ige Kontamination mit unserem Jakobs-Kreuzkraut zu einer täglichen Aufnahme von 626,9 mg PA und eine 10%-ige Jakobs-Kreuzkraut Kontamination aus unserer Studie zu einer täglichen Aufnahme von 1253,8 mg PA führen. Beide Kontaminationen würden den TDI von PETZINGER (2011b) um mehr als das 1000-fache und

Diskussion

den berechneten NOAEL um mehr als das 10.000-fache überschreiten (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2003).

Die Europäische Union hat den Umgang mit potenziell gesundheitsschädlichen Futtermitteln gesetzlich geregelt. EU (EG) 178/2002: „Futtermittel, die nicht sicher sind, dürfen nicht in Verkehr gebracht oder an der Lebensmittelgewinnung dienende Tiere verfüttert werden. Futtermittel gelten als nicht sicher in Bezug auf den beabsichtigten Verwendungszweck, wenn davon auszugehen ist, dass sie die Gesundheit von Menschen oder Tier beeinträchtigen können [...]“. Die Verordnung (EG) 767/2009 erweitert diese Regelung für nicht-lebensmittelliefernde Tiere.

Im Nationalen Recht ist der Umgang mit kontaminierten Futtermitteln im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch §17 wie folgt geregelt: „[...] Es ist ferner verboten, Futtermittel für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass sie bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Verwendung geeignet sind, die tierische Gesundheit zu schädigen [...]“

Somit ist das Inverkehrbringen sowie die Verfütterung von potenziell schädlichen Futtermitteln und dadurch die Verfütterung von mit Jakobs-Kreuzkraut kontaminiertem Heu in Deutschland und der Europäischen Union verboten.

Fazit

Zwei der sechs Pferde aus diesem Versuch waren nicht in der Lage Jakobs-Kreuzkraut aus dem Heu auszusortieren. Zwei weitere Pferde zeigten ein variables Selektionsverhalten. Nur zwei Pferde sortierten Jakobs-Kreuzkraut in den beiden unterschiedlichen Kontaminationsgraden (5% und 10% Jakobs-Kreuzkraut) über die gesamte Versuchszeit aus. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich das Selektionsverhalten von Pferden bezüglich Jakobs-Kreuzkraut im Heu individuell stark unterscheidet. Es ist somit unwahrscheinlich, dass Pferde grundsätzlich Jakobs-Kreuzkraut selektieren können, selbst unter den Bedingungen der ad libitum Heuzuteilung. Bereits die Aufnahme von geringen Mengen an Jakobs-Kreuzkraut (> 1µg PA/kg KGW nach PETZINGER (2011b)) über einen längeren Zeitraum (Wochen - Monate) kann zu schweren Vergiftungen führen. Deshalb sollte die Jakobs-Kreuzkraut Kontamination nach dem ALARA-Prinzip so gering wie nur möglich gehalten werden. Grünflächen, die mit Jakobs-Kreuzkraut kontaminiert sind, sollten nicht für die Futterproduktion für Pferde genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Louisa Esmeralda Maria Sroka

Selektionsverhalten von Pferden in Bezug auf Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio Jacobaea* L.) im Heu

Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im März 2022

38 Seiten, 1 Abbildung, 1 Tabelle, 67 Referenzen, Anhang

Schlüsselwörter: Selektionsverhalten, Pyrrolizidinalkaloide, *Senecio jacobaea* L., Giftpflanzen, ad libitum

Einleitung: Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio Jacobaea* L., JKK) enthält die toxischen Pyrrolizidinalkaloide (PA) als sekundäre Pflanzenmetabolite. Durch eine Aufnahme von JKK kann es zu schweren Leberschäden bei Pferden kommen. In den vergangenen Jahren ist durch Faktoren wie den Klimawandel oder unzureichendes Grünlandmanagement ein starker Anstieg der JKK Population in Deutschland und somit auch eine vermehrte JKK-Kontamination im Heu zu verzeichnen.

Ziel der Studie: Das Ziel der Studie war die Überprüfung, ob Pferde unter ad libitum Heufütterung in der Lage sind, JKK aus dem kontaminierten Heu auszusortieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pferde unter diesen Bedingungen JKK aus dem kontaminierten Heu ausselektieren können.

Methoden: Für die randomisierte Studie (genehmigt durch die Landesdirektion Sachsen TVV 17/19) standen sechs adulte, gesunde Warmblutwallache (11-17 Jahre alt, mittleres Körpergewicht (\pm SD): 674 ± 85 kg) zur Verfügung. Die Pferde wurden in Boxen auf Stroh gehalten und hatten täglichen Auslauf auf einem Paddock. Die Basisration bestand aus Heu ad libitum, einem vitaminisierten Mineralfuttermittel (Hoeveler Reformin Plus®) sowie Wasser ad libitum. Eine definierte Menge mit JKK (5% und 10%) kontaminiertes Heu wurde zu unterschiedlichen Tageszeiten über 60 Minuten vorgelegt. Das Fressverhalten der Pferde bezüglich des kontaminierten Heus wurde überwacht (Protokoll und Video). Falls ein Pferd in dieser Zeit zwei Stängel JKK aufnahm, wurde die Fütterung unterbrochen und an einem anderen Tag zu einer anderen Tageszeit wiederholt. Bei einer wiederholten Aufnahme von zwei Stängeln JKK wurde das Pferd aus dem Versuch ausgeschlossen. Es wurden alle zwei bis drei

Zusammenfassung

Tage klinische Untersuchungen durchgeführt und zusätzlich zu Beginn und am Ende des Versuchs Blutproben entnommen und z.B. auf Leberparameter analysiert. PA-Gehalte wurden in frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial sowie in den getrockneten Blüten, Blättern und Stängeln gemessen. Zusätzlich wurden in Heuproben und JKK Rohnährstoffe und Faserfraktionen analysiert. Die Daten wurden deskriptiv mit Microsoft Excel 2016® und statistisch mittels SPSS® ausgewertet. Die Ergebnisse wurden auf Normalverteilung überprüft und im Folgenden mit einem gepaarten T-Test bei Normalverteilung (Blutparameter) und einem Mann-Whitney-U Test bei nicht normal verteilten Daten (Rohnährstoffe) ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse: Zwei der sechs Pferde mussten nach drei von zwölf Beobachtungsperioden aufgrund einer zweimaligen JKK-Aufnahme aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Zwei Pferde zeigten ein variables Selektionsverhalten und mussten nach neun bzw. elf von zwölf Beobachtungsperioden aufgrund von zweimaliger JKK-Aufnahme aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Nur zwei Pferde waren in der Lage, die unterschiedlichen Kontaminationsgrade an JKK (5 % und 10 %) über die ganze Versuchszeit auszusortieren. Die Aufnahme von JKK während der Versuchsperioden war gleichmäßig über die 60 Minuten der Beobachtungsperioden verteilt. Alle leberspezifischen Blutparameter wie z.B. die Glutamat-Dehydrogenase (Beginn der Studie: $2,02 \pm 0,293$ U/l, Ende der Studie: $2,92 \pm 1,79$ U/l) waren vor und nach dem Versuch im Referenzbereich. Die PA-Gehalte waren in den getrockneten Blüten mit $5033 \mu\text{g/g}$ Trockensubstanz (TS) am höchsten, gefolgt von den getrockneten Blättern ($2201 \mu\text{g/g}$ TS) und den getrockneten Stängeln ($590 \mu\text{g/g}$ TS). Der PA-Gehalt in frischem ($1189 \mu\text{g/g}$ TS) und getrocknetem JKK ($1044 \mu\text{g/g}$ TS) war vergleichbar hoch. Die Rohprotein- (XP: $3,50 \pm 0,241$ %) und Rohfettgehalte (XL: $0,611 \pm 0,213$ %) im JKK waren niedriger ($p < 0,05$) als in den Heuproben (XP: $9,37 \pm 1,59$ %, XL: $1,62 \pm 0,414$ %), während der Gehalt an Säure-Detergenz-Faser (ADF: $45,42 \pm 1,74$ %) und Lignin ($5,32 \pm 0,311$ %) im JKK signifikant höher war als in den Heuproben (ADF: $36,3 \pm 3,21$ %, Lignin: $3,8 \pm 0,938$ %).

Schlussfolgerung: Es stellte sich ein individuelles Selektionsverhalten der Pferde dar. Daher kann selbst bei einem Fütterungsmanagement mit Heuaufnahme ad libitum, wodurch kein vermehrtes Hungergefühl zu erwarten ist, eine Aufnahme von JKK nicht ausgeschlossen werden. Im Hinblick auf die Gefahr einer chronischen Intoxikation mit PA sollte die Verfütterung von mit JKK-kontaminiertem Heu vermieden werden. Grünflächen mit JKK-Bewuchs sollten nicht zur Futterproduktion genutzt werden und Maßnahmen (z.B. spezifische Mahd) zur Reduktion von JKK auf Futterflächen sollten eingesetzt werden.

6 Summary

Louisa Esmeralda Maria Sroka

Horses' rejection behaviour towards the presence of *Senecio jacobaea* L. in hay

Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in March 2022

38 pages, 1 figure, 1 table, 67 references, appendix

Keywords: Selection behaviour, pyrrolizidine alkaloids, tansy ragwort, toxic plants, ad libitum,

Introduction: *Senecio jacobaea* L. (SJ) contains the toxic secondary metabolite pyrrolizidine alkaloids (PA). SJ ingestion can lead to severe liver intoxication. The SJ population in Germany elevated during the last years, due to reasons like climate change or a lack of pasture management. With this also the risk of hay contamination with SJ increased.

Aim of the study: The aim of this study was to examine the ability of horses to reject toxic plants such as SJ under ad libitum hay provision. We hypothesized that horses are able to sort out SJ from hay, when fed with hay ad libitum.

Methods: For the randomized study (approved by the district authority in Saxony TVV 17/19), six adult, healthy warmblood horses (11-17 years old, mean (\pm SD) body weight: 674 ± 85 kg) were used. The horses were housed in boxes with straw bedding. Horses had access to a paddock several hours daily. The basis ration included hay ad libitum, and a vitaminized mineral supplement (Hoeveler Reformin Plus®). Tap water was available at all times. Defined amounts of hay contaminated with 5% or 10% dried SJ were provided over one hour at different daytimes. Feeding behaviour towards SJ-contaminated hay was observed (protocol, video). In case of poisonous plant intake, the session was terminated but repeated at another day and another daytime. When SJ was ingested a second time, the horse was excluded from the experiment. Clinical examinations were performed every two to three days. Additionally, blood samples were taken and analysed (e.g. liver parameters) before and after the trial. Toxin analyses (PA) were performed in SJ samples. PA contents were measured in fresh and dried plant

Summary

material as well as in dried flowers, leaves and stems separately. Furthermore, crude nutrients and fibre fractions were measured in both SJ and hay. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2016[®] and SPSS 27[®]. Data were tested for normal distribution. A paired t-test was performed for normally distributed data such as blood parameters. A Mann-Whitney-U test for unpaired samples was used for non-normal distributed data such as crude nutrients. Significance level was set at $p < 0.05$.

Results: Two out of six horses had to be excluded after three out of 12 observation periods from the study due to repeated SJ intake. Two other horses showed an inconsistent rejection of SJ and had to be excluded after nine and 11 out of 12 observation periods, because of repeated SJ intake. Only two horses were able to pick out the various amounts of SJ (5 and 10 %) during the whole trial. The uptake of SJ during the observation periods was evenly distributed over 60 minutes. All tested liver specific blood parameters before and after the experiment e.g. glutamate-dehydrogenase (begin of the study: 2.02 ± 0.293 U/L, end of the study: 2.92 ± 1.79 U/L) were within the physiological range. PA levels were highest in dried flowers ($5033 \mu\text{g/g}$ dry matter [DM]), followed by dried leaves ($2201 \mu\text{g/g}$ DM). The lowest content was found in the dried stems ($590 \mu\text{g/g}$ DM). The PA content in the dried plant material ($1044 \mu\text{g/g}$ DM) was comparable to the PA-content in fresh plant material ($1189 \mu\text{g/g}$ DM). Crude protein (3.50 ± 0.241 %) and crude lipids (0.611 ± 0.213 %) were lower in SJ ($p < 0.05$) than in hay samples (crude protein: 9.37 ± 1.59 %, crude lipids: 1.6 ± 0.414 %), while acid-detergent-fibre (ADF) (45.42 ± 1.74 %) and lignin (5.32 ± 0.311 %) were higher in SJ ($p < 0.05$) than in hay samples (ADF: 36.3 ± 3.21 %, lignin: 3.8 ± 0.938 %).

Conclusion: The horses showed an individual rejection behaviour during the experiment. According to this an intake of SJ cannot be avoided despite satiety was ruled out by feeding hay ad libitum. Due to the risk of a chronic intoxication by PA intake, feeding SJ-contaminated hay should be avoided. Grasslands with SJ vegetation are considered inappropriate for feed production. Interventions to reduce SJ growth (e.g. specific mowing) should be used on forage areas.

7 Literaturverzeichnis

Aboling S, Vervuert I. Nutztiergefährdung. In: Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen, Hrsg. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 33–5.

Anadón A, Martínez-Larranga MR, Ares I, Martínez M. Poisonous Plants of the Europe. In: Gupta RC, Hrsg. Veterinary toxicology: Basic and clinical principles. 3. Aufl. Amsterdam: Academic Press; 2018. p.891–910.

Berendonk C, Cerff D, Hünting K, Wiedenfeld H, Becerra J, Kuschak M. Pyrrolizidine alkaloid level in *Senecio jacobea* und *Senecio eriaticus*- the effect of plant organ and forage conservation. Grassland in a changing world. Proceedings of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation, 29th August - 2nd September 2010; Kiel, Germany. Duderstadt: Mecke Druck und Verlag. p. 669–71.

Bolzan AMS, Bonnet OJF, Wallau MO, Basso C, Neves AP, Carvalho PCdF. Foraging Behavior Development of Foals in Natural Grassland. *Rangeland Ecol Manag.* 2020;73:243–51. doi: 10.1016/j.rama.2019.10.011.

Burritt EA, Provenza FD. Food aversion learning: ability of lambs to distinguish safe from harmful foods. *J Anim Sci.* 1989;67:1732–9. doi: 10.2527/jas1989.6771732x.

Cairns MC, Cooper JJ, Davidson HP, Mills DS. Association in horses of orosensory characteristics of foods with their post-ingestive consequences. *Anim Sci.* 2002;75:257-65. doi: 10.1017/S1357729800053017.

Caloni F, Cortinovia C. Plants poisonous to horses in Europe. *Equine Vet Educ.* 2015;27:269–74. doi: 10.1111/eve.12274.

Candrian U, Luethy J, Schmid P, Schlatter C, Gallasz E. Stability of pyrrolizidine alkaloids in hay and silage. *J Agric Food Chem.* 1984;32:935–7. doi: 10.1021/jf00124a057.

Literaturverzeichnis

Coenen M, Vervuert I. Pferdefütterung. 6. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020.

Craig AM, Pearson EG, Meyer C, Schmitz JA. Clinicopathologic studies of tansy ragwort toxicosis in ponies: sequential serum and histopathological changes. *J Equine Vet Sci.* 1991;11:261–71. doi: 10.1016/S0737-0806(06)81312-2.

Crews C, Anderson WAC. Detection of ragwort alkaloids in toxic hay by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Vet Rec.* 2009;165:568–9. doi: 10.1136/vr.165.19.568.

Cummins R, Coffey K, Jack N, Jogan K, Rhein R, Philipp D et al. Palatability of teff grass by horses. *Animal Science Undergraduate Honors Theses. University of Arkansas System* 2014;44–9.

Curran J, Sutherland R, Peet R. A screening test for subclinical liver disease in horses affected by pyrrolizidine alkaloid toxicosis. *Aust Vet J.* 1996;74:236–40. doi: 10.1111/j.1751-0813.1996.tb15411.x.

Frohne D, Pfänder HJ. Giftpflanzen: Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen. 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2004.

Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids—genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev.* 2004;36:1–55. doi: 10.1081/DMR-120028426.

Giles CJ. Outbreak of ragwort (*Senecio jacobea*) poisoning in horses. *Equine Vet J.* 1983; 15:248–50. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01781.x

Goodwin D, Davidson HP, Harris P. Selection and acceptance of flavours in concentrate diets for stabled horses. *Appl Anim Behav Sci.* 2005;223–32. doi: 10.1016/j.applanim.2005.04.007.

Grabner A. Enzootic liver cirrhosis and hepatic encephalopathy in horses after intoxication caused by *senecio alpinus*. *Pferdeheilkunde.* 1990;6:119–24. doi: 10.21836/PEM19900303.

Literaturverzeichnis

- He Y-Q, Yang L, Liu H-X, Zhang J-W, Liu Y, Fong A et al. Glucuronidation, a new metabolic pathway for pyrrolizidine alkaloids. *Chem Res Toxicol.* 2010;23:591–9. doi: 10.1021/tx900328f.
- Hepper PG. Foetal learning: implications for psychiatry? *Br J Psychiatry.* 1989;155:289–93. doi: 10.1192/bjp.155.3.289.
- Haupt KA, Zahorik DM, Swartzman-Andert JA. Taste aversion learning in horses. *J Anim Sci.* 1990;68:2340. doi: 10.2527/1990.6882340x.
- Huckauf A. Bekämpfung - Biologische Verfahren. In: *Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen*, Hrsg. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 46-7.
- Huckauf A. Bekämpfung - Mechanische Verfahren. In: *Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden – bekämpfen*, Hrsg. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 40-3.
- Hussain SM, Herling VR, Rodrigues PHM, Naz I, Khan H, Khan MT. Mini review on photosensitization by plants in grazing herbivores. *Trop Anim Health Prod.* 2018;50:925-35. doi: 10.1007/s11250-018-1583-x.
- Kaltner F, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *J Agric Food Chem.* 2018;66:5221–8. doi: 10.1021/acs.jafc.7b06036.
- Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 01. Sept. 2005. §17 (10. Aug. 2021).
- Lütt S, Huckauf A. Biologie. In: *Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden – bekämpfen*, Hrsg.: Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 7–17.
- Marinier SL, Alexander AJ. Selective grazing behaviour in horses: development of methodology and preliminary use of tests to measure individual grazing ability. *Appl Anim Behav Sci.* 1991;30:203–21. doi: 10.1016/0168-1591(91)90129-L.

Literaturverzeichnis

Mattocks AR, White INH. The conversion of pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydropyrrolizine derivatives by rat-liver microsomes in vitro. *Chem-Biol Interact.* 1971;3:383–96. doi: 10.1016/0009-2797(71)90018-4.

McEvoy P, Cox C, Coombs E. Successful Biological Control of Ragwort, *Senecio Jacobaea*, by Introduced Insects in Oregon. *Ecol Appl.* 1991;1:430–42. doi: 10.2307/1941900.

Mendel VE, Witt MR, Gitchell BS, Gribble DN, Rogers QR, Segall HJ et al. Pyrrolizidine alkaloid-induced liver disease in horses: an early diagnosis. *Am J Vet Res.* 1988;49:572-8. ISSN: 0002-9645

Metzing D, Garve E, Matzke-Hajek G, Adler J, Bleeker W, Breunig T et al. Rote Liste und Gesamtartenliste der Farn und Blütenpflanzen Deutschlands. In: Aktuelle Bewertung der roten Liste. Hrsg. Bundesamt für Naturschutz. Bonn-Bad Godesberg; 2018. p. 7–13.

National Toxicology Program (NTP) 2003. Toxicological Report of the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Riddelliine (CAS No. 23246-96-0) in F344/N Rats and B6C3F1Mice (Gavage Studies); 2003:1-282.

Neitzke A, Berendonk C. Jakobskreuzkraut (*Senecio jacobea*): Eine Giftpflanze auf dem Vormarsch. Münster: Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen; 2011.

Nolte DL, Provenza FD. Food preferences in lambs after exposure to flavors in milk. *Appl Anim Behav Sci.* 1992;32:381–9. doi: 10.1016/S0168-1591(05)80030-9.

O’Keeffe CM, Stutte GW, Mc Keon-Bennett M. Ragwort: Invasive Weed and Potential Pharmaceutical. *Hortic Res.* 2015:145-183. doi:10.1002/2F9781119107781.

Panther KE, Welch KD, Gardner DR, Lee ST, Green BT, Pfister JA et al. Poisonous Plants in the United States. In: Gupta RC, Hrsg. *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles*. 3. Aufl. Amsterdam: Academic Press; 2018. p. 837–91.

Petzinger E. Pyrrolizidinalkaloide und die Seneciose bei Tieren: Teil 1: Vorkommen, Chemie, Toxikologie. *Tierarztl Prax. Ausg G* 2011a; 39:221–30. doi: 10.1055/s-0038-1623063.

Literaturverzeichnis

- Petzinger E. Pyrrolizidinalkaloide und die Seneciose bei Tieren: Teil 2: Klinik, Speziesunterschiede, Rückstandsverhalten, Futtermittelkontamination und Grenzwerte. *Tierärztl Prax.* 2011b;39:363–72. doi: 10.1055/s-0038-1623090
- Pfeil W. Bekämpfen - Chemische Verfahren. In: *Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen*, Hrsg. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 43-6.
- Pfister JA, Stegelmeier BL, Cheney CD, Gardner DR. Effect of previous locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis* species) intoxication on conditioned taste aversions in horses and sheep. *J Anim Sci.* 2007;85:1836–41. doi: 10.2527/jas.2007-0046.
- Pohlmann J, van Loon G, Lefère L, Vanschandevijl K, Deprez P. Hepatoencephalopathy caused by *Senecio jacobaea* intoxication in five horses. *Vlaams Diergen Tijds* 2005;74:440–5. ISSN: 0303-9021
- Provenza FD, Burritt EA. Socially induced diet preference ameliorates conditioned food aversion in lambs. *Appl Anim Behav Sci.* 1991;31:229–36. doi: 10.1016/0168-1591(91)90007-K.
- Provenza FD, Lynch JJ, Burritt EA, Scott CB. How goats learn to distinguish between novel foods that differ in postingestive consequences. *J Chem Ecol.* 1994;20:609–24. doi: 10.1007/BF02059601.
- Provenza FD, Pfister JA, Cheney CD. Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxins in herbivores. *J Range Manage.* 1992;45:36-45. doi: 10.2307/4002523
- R. W. Pemberton, C. E. Turner. Biological control of *Senecio jacobaea* in Northern California, an enduring success. *Entomophaga.* 1990;35:71–7. doi: 10.1007/BF02374303.
- Rabe I, Huckauf A. Meiden. In: *Umgang mit dem Jakobs-Kreuzkraut: Meiden - dulden - bekämpfen*, Hrsg. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR). 4. Aufl. 2017. p. 36.
- Randall RP, Schurg WA, Church DC. Response of horses to sweet, salty, sour and bitter solutions. *J Anim Sci.* 1978;47:51–5. doi:10.2527/jas1978.47151x.

Literaturverzeichnis

Redgate SE, Cooper JJ, Hall S, Eady P, Harris PA. Dietary experience modifies horses' feeding behavior and selection patterns of three macronutrient rich diets. *J Anim Sci.* 2014;92:152430. doi:10.2527/jas.2012-5579.

Ruan J, Yang M, Fu P, Ye Y, Lin G. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis. *Chem Res Toxicol.* 2014;27:1030–9. doi: 10.1021/tx500071q.

Schwabe M. Wichtige Giftpflanzen des Grünlandes. Jena: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft 2014.

Siegrist-Maag S, Lüscher A, Suter M. Reaktion von Jakobs-Kreuzkraut auf Schnitt. *Agrarforsch.* 2008;15:338–43.

Staniar WB, Bussard JR, Repard NM, Hall MH, Burk AO. Voluntary intake and digestibility of teff hay fed to horses. *J Anim Sci.* 2010;88:3296–303. doi:10.2527/jas.2009-2668.

Stegelmeier BL. Pyrrolizidine alkaloid-containing toxic plants (Senecio, Crotalaria, Cynoglossum, Amsinckia, Heliotropium, and Echium spp.). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27:419428. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.02.013.

Turner S, Cesselli S. Operational field guide to the establishment of tansy ragwort biocontrol agents in British Columbia; Victoria, B.C., Prov. B.C.; 2013.

van den Berg M, Giagos V, Lee C, Brown WY, Cawdell-Smith AJ, Hinch GN. The influence of odour, taste and nutrients on feeding behaviour and food preferences in horses. *Appl Anim Behav Sci.* 2016a;184:4150. doi: 10.1016/j.applanim.2016.08.015.

van den Berg M, Giagos V, Lee C, Brown WY, Hinch GN. Acceptance of novel food by horses: the influence of food cues and nutrient composition. *Appl Anim Behav Sci.* 2016b;183:59–67. doi: 10.1016/j.applanim.2016.07.005.

Vandenbroucke V, Van Pelt H, De Backer P, Croubels S. Animal poisonings in Belgium: A review of the past decade. *Vlaams Diergen Tijds* 2010; 79(4):259–68. ISSN: 03039021

Literaturverzeichnis

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Jan. 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. L 31/1 (01. Feb. 2002).

Verordnung (EG) Nr. 767/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Juli 2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln, zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinien 79/373/EWG des Rates, 80/511/EWG der Kommission, 82/471/EWG des Rates, 83/228/EWG des Rates, 93/74/EWG des Rates, 93/113/EG des Rates und 96/25/EG des Rates und der Entscheidung 2004/217/EG der Kommission. L 229/1 (01. Sept. 2009).

Vervuert I. Raufuttermittelsversorgung bei Pferden in Zeiten knapper Heu- bzw. Heulagevorräte: Maßnahmen für die Praxis. Tierärztl Umsch. 2020;75:88–91.

Villalba JJ, Provenza FD. Discriminating among novel foods: effects of energy provision on preferences of lambs for poor-quality foods. Anim Behav Sci. 2000:87–106. doi: 10.1016/S0168-1591(99)00066-0.

Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2011;28:282–92. doi: 10.1080/19440049.2010.541288.

Wink, M., 1992a, Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassungen der Pflanzenfresser, in: *“Lupinen 1991—Forschung, Anbau und Verwertung*, Hrsg. M. Wink, University of Heidelberg Press, Heidelberg, p. 130–156.

Wölfle U, Schempp CM. Bitterstoffe-von der traditionellen Verwendung bis zum Einsatz an der Haut. Z Phytother. 2018;39:210–5. doi: 10.1055/a-06541711.

Xu J, Wang W, Yang X, Xiong A, Yang L, Wang Z. Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism. Liver Res. 2019;3:176–84. doi: 10.1016/j.livres.2019.11.004.

Yang M, Ma J, Ruan J, Ye Y, Fu PP-C, Lin G. Intestinal and hepatic biotransformation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to toxic pyrrolizidine alkaloids. Arch Toxicol. 2019;93:2197–209. doi: 10.1007/s00204019024992.

8 Anhang

8.1 Liste der Vorträge im Rahmen dieser Thesis

2020

66. Jahreskongress der DVG: DVG-Fachgruppe Tierernährung, Gießen, Deutschland

Sroka L, Müller C, Hass M-L, Wahl L, Starzonek, J, Aboling S, Vervuert I. Ermittlung einer Toleranzschwelle von Jakobs-Kreuzkraut (*Senecio jacobaea*) im Heu für Pferde
In: Tagungsunterlagen Tierernährung, Gießen: DVG Service GmbH, 2020, S. 27-28, ISBN: 978-3-86345-553-8

2021

9. Leipziger Doktorandenforum, Leipzig, Deutschland

Sroka L., Mueller C, Hass M-L, Aboling S, Vervuert I Are horses able to pick out Tansy ragwort (*Senecio jacobaea L.*) out of contaminated hay?
In: Programm & Abstracts 9. Leipziger Doktorand:innenforum, 1. Auflage, Leipzig, 2021, S. 15

8.2 Weitere Publikationen

8.2.1 Veröffentlichte Artikel

2020

Vervuert I, Müller C, Sroka L. Aktuelle Vergiftungsfälle durch Pflanzen – Was ist beim Pferd zu beachten? *Pferdespiegel*. 2020; 23(03): 125 – 137, DOI: 10.1055/a-1213-8635

2021

Mueller, C., Sroka, L., Hass, M.-L., Aboling, S., These, A., & Vervuert, I. (2021). Rejection behaviour of horses for hay contaminated with meadow saffron (*Colchicum autumnale L.*). *J Anim Physiol An N*, 00, 1– 8. DOI: 10.1111/jpn.13648

8.2.2 Veröffentlichte Konferenzbeiträge

2020

66. Jahreskongress der DVG: DVG-Fachgruppe Tierernährung, Gießen, Deutschland

Müller C, Sroka L, Hass M-L, Aboling S, Vervuert I. Untersuchung zum Selektionsverhalten von Pferden für Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) im Heu
In: Tagungsunterlagen Tierernährung, Gießen: DVG Service GmbH, 2020, S. 25-26, ISBN: 978-3-86345-553-8

2021

9. Leipziger Doktorandenforum, Leipzig, Deutschland

Mueller C, Sroka L, Hass M-L, Aboling S, Vervuert I Selection behaviour of horses related to hay contaminated with Meadow Saffron
In: Programm & Abstracts 9. Leipziger Doktorand:innenforum, 1. Auflage, Leipzig, 2021, S. 14

9 Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich während des Schreibens meiner Doktorarbeit unermüdlich unterstützt haben. Zuallererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Vervuert bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt zu arbeiten und meine Doktorarbeit anzufertigen. Mit ihren unzähligen Korrekturen und einem offenen Ohr hat sie es immer wieder geschafft, mich zu motivieren. Sie hat mir während der letzten zwei Jahre die Möglichkeit gegeben, mich sowohl beruflich als auch persönlich weiterzuentwickeln.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Kollegin Clara Müller, die mir trotz aller Widrigkeiten mit viel Humor und Tatendrang zur Seite gestanden hat. Ob lange Nächte und Tage im Stall, das Vorbereiten von Vorträgen oder das wissenschaftliche Schreiben, nichts davon wäre ohne sie denkbar gewesen. Ich freue mich, über die gemeinsame Zeit nicht nur einen tollen Menschen kennengelernt, sondern auch eine neue Freundin gewonnen zu haben. Die Zusammenarbeit wird mir fehlen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Anja These vom Bundesinstitut für Risikobewertung für die Messungen der Pyrrolizidinalkaloide sowie verschiedene Nachmessungen und die Beantwortung jedweder Fragen bedanken. Auch der Bundesstiftung Umwelt möchte ich für die finanzielle Ermöglichung dieses Projektes danken.

Dankbar bin ich außerdem besonders den Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik. Jeder einzelne hat das Projekt mit unterstützt und zu seinem Erfolg beigetragen. Ob in persönlichen oder in praktischen Dingen standen mir alle mit Rat und Tat zur Seite. Insbesondere Frau Dr. Janine Starzonek hat mich bei jedweden Fragen oder Problemen als Freundin und Kollegin mit viel Fachwissen und Empathie unterstützt. Zudem möchte ich Lisa Wahl, die mit ständiger Hilfe in aufreibenden Situationen mit viel Ruhe zur Seite stand, und Elena Theiner, die mit ihrer unnachahmlich pragmatischen Art zu so mancher Problemlösung beitragen konnte, danken. Auch für die Versorgung und Betreuung der Pferde möchte ich mich bei Sabine Kleemann und Michael Wacker bedanken sowie bei Jana Tietke und Beatrice Ladányi für ihre Hilfe im Labor.

Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt meiner gesamten Familie, insbesondere meinem Vater, meinem Bruder und meiner Oma, für ihre unermüdliche Unterstützung. Ebenfalls ein Dank geht an meinen Cousin Prof. Dr. Bernhard Renard für die außerplanmäßige Unterstützung bei statistischen Fragen. Zu guter Letzt möchte ich meinem Partner Nico-Frédéric Beyer für seine bedingungslose, sowohl mentale als auch fachliche Hilfe danken.