

BIOFUMIGATION - CHEMISCHE HINTERGRÜNDE DES VERFAHRENS

WOLFGANG SCHÜTZE¹, MICHAELA SCHLATHÖLTER², RITA GROSCH³, MATTHIAS DAUB⁴, JOHANNES HALLMANN⁵; Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg; ²P. H. Petersen Saatzucht Lundsgaard GmbH, 24977 Grundhof; ³Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. (IGZ), Echtermeyer Weg 1, 14979 Großbeeren; ⁴JKI, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Dürener Straße 71, 50189 Elsdorf; ⁵JKI, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Toppheideweg 88, 48161 Münster; e-mail: wolfgang.schuetze@jki.bund.de

Prinzip der Biofumigation

Der Begriff „Biofumigation“ wurde 1993 von Kirkegaard et al. eingeführt zur Beschreibung der suppressiven Wirkung von Kruziferen gegenüber bodenbürtigen Schaderregern. Es wird darunter eine agronomische Technologie verstanden, die einige, die Pflanzen schützende Enzymsysteme, in diesem Fall das „**Myrosinase/Glucosinolat-System**“ der *Brassicaceae*, ausnützt.

Die Biofumigation als natürliches und umweltfreundliches Verfahren stellt eine Alternative zum Einsatz chemischer Bodenbegasungs- und Pflanzenschutzmittel dar (Brown & Mora 1997, Lazzeri & Manici 2000, Kirkegaard & Matthiessen 2004, Lazzeri et al. 2004, Matthiessen & Kirkegaard 2006). Die Entwicklung der Biofumigation wurde insbesondere in Australien, USA und Italien intensiv vorangetrieben. In diesen Ländern wurde u. a. das chemische Bodenbegasungsmittel Methylbromid (CH₃Br) noch bis vor kurzem intensiv eingesetzt und auf Grund des Anwendungsverbotes musste nun dringend auf alternative Bekämpfungsverfahren umgestellt werden.

Obwohl die toxische Wirkung der aus den Glucosinolaten (GSL) entstehenden Isothiocyanate (ITC) gegen bodenbürtige Pflanzenschädlinge seit langem bekannt ist (Walker et al. 1937), stellt ihre natürliche Nutzung über die Biofumigation ein sehr junges Verfahren dar, bei dem durch weitere Optimierungsstrategien noch deutliche Wirkungssteigerungen zu erwarten sind. Die Umsetzung durch das Enzym „**Myrosinase**“ ist abhängig vom **pH-Wert** des Bodens, der **Bodentemperatur**, dem **Wassergehalt** des Bodens und dem/den in der Pflanze vorliegenden

Glucosinolat(en). Auch der **Schwefelgehalt** des Bodens beeinflusst das Biofumigationsverfahren. Da es sich bei den Glucosinolaten um S-haltige Verbindungen handelt, muss die Pflanze den zur Bildung der Glucosinolate notwendigen Schwefel aus dem Boden beziehen (Abb. 1). Falk et al. (2007) haben den teilweise erheblichen Einfluss der S-Düngung auf die Höhe des Glucosinolatgehaltes in einer Übersicht zusammengefasst (Tab. 1).

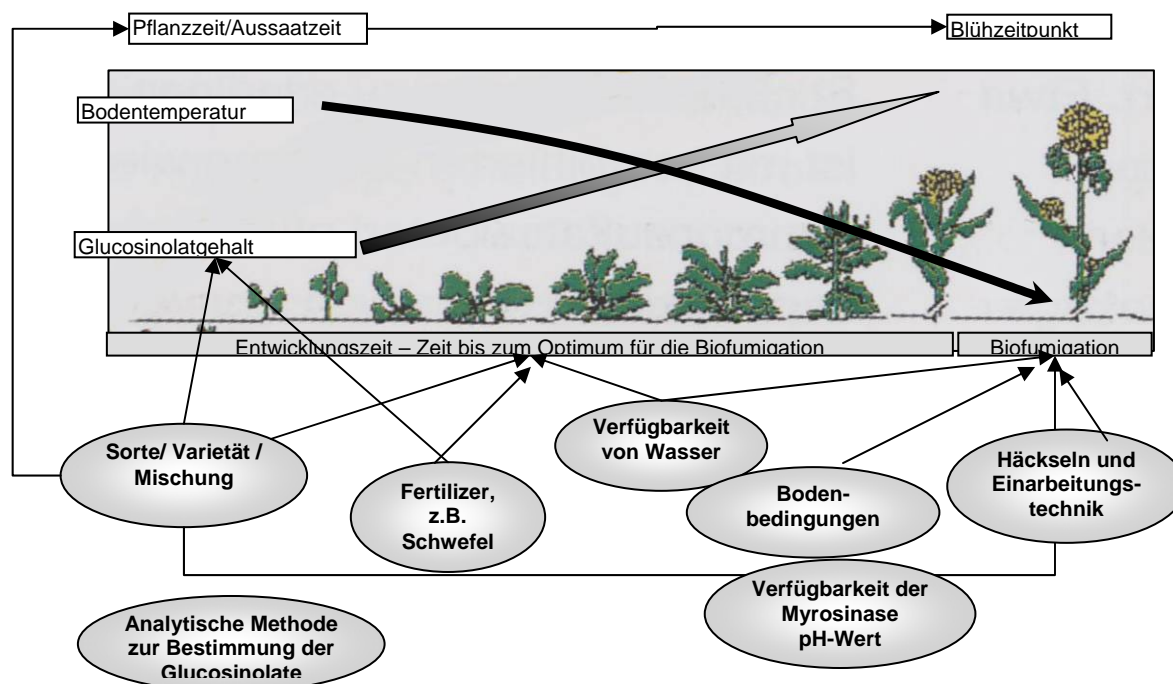


Abb. 1: Einflussfaktoren auf das Biofumigationsverfahren.

Bei der „Biofumigation“ werden Pflanzen mit einem möglichst hohen Gehalt an Glucosinolaten als Zwischenfrüchte angebaut. Es sind vor allem Weißer Senf (*Sinapis alba*), Ölrettich (*Raphanus sativus*), Ölrauke (= "Rucola", *Eruca sativa*), Sareptasenf (= Brauner Senf, *Brassica juncea*) und Schwarzer Senf (*B. nigra*). Die Pflanzen werden zum Zeitpunkt der Blüte fein gehäckselt und in den Boden eingearbeitet. Während des biologischen Abbaus der Pflanzen werden nun die Glucosinolate in Thio- bzw. Isothiocyanate umgewandelt (siehe unten), die die eigentlichen Wirkstoffe darstellen.

Tabelle 1: Übersicht über den Einfluss der S-Düngung auf den Gehalt an Glucosinolaten in einzelnen Brassica-Genotypen (Falk et al. 2007).

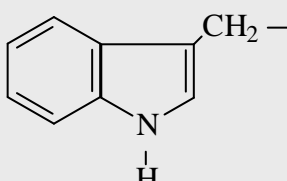
A - Feldexperiment					
Genotyp	niedrige S-Behandlung	hohe S-Behandlung	Total GSL S-niedrig	Total GSL S-hoch	Veränd. GSL-Gehalt (%)
<i>Brassica oleracea</i> L.	0 kg S/ha	110 kg S/ha	2,26 µmol/g FW	2,86 µmol/g FW	+ 26
<i>Brassica napus</i>	0 kg S/ha	80 kg S/ha	15,8 µmol/g (seed)	41,2 µmol/g (seed)	+ 161
	0 kg S/ha	100 kg S/ha	2,59 µmol/g	4,2 µmol/g	+ 62
<i>B. oleracea</i> L. <i>italica</i>	0 kg S/ha	23 kg S/ha	363,4 mg/leaf	529,2 mg/leaf	+ 46
	0 kg S/ha	23 kg S/ha	308,6 mg/head	419,3 mg/head	+ 36
<i>B. oleracea</i> L. <i>italica</i> var. Maraton	15 kg S/ha	150 kg S/ha	51,8 µmol/g dw	36,2 µmol/g dw(K.fr.)	- 30
	15 kg S/ha	150 kg S/ha	30,6 µmol/g dw	52,5 µmol/g dw(K.sp.)	+ 72
<i>B. oleracea</i> L. <i>italica</i> var. Monterrey	15 kg S/ha	150 kg S/ha	32,2 µmol/g dw	78,4 µmol/g dw(K.fr.)	+ 144
	15 kg S/ha	150 kg S/ha	84,9 µmol/g dw	69,6 µmol/g dw(K.sp.)	- 18
B - Gewächshaus					
<i>Brassica napus</i>	0,9 mM SO ₄ ²⁻	18,3mM	11,3 µmol/g dw	153,8 µmol/g dw	+ 1261
<i>Brassica rapa</i>	0,5 mM SO ₄ ²⁻	1,0 mM	28,4 µmol/g dw	80 µmol/g dw	+ 182
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ambient SO ₂	706 nl/L SO ₂	1,3 µmol/g dw	13,1 µmol/g dw	+ 908
K - Kopf fr. - früh sp. - spät					

Da die Biofumigation als Zwischenfrucht erfolgt, sind die grundsätzlichen Vorteile eines Zwischenfruchtanbaus, wie z. B. Bodenverbesserung durch Zufuhr von organischer Substanz und Verbesserung des Wasserhaushaltes auch hier gegeben. Gleichzeitig erfolgt mit der Einbringung des Pflanzenmaterials in den Boden auch eine Bekämpfung bodenbürtiger Schaderreger.

Chemie der Glucosinolate

Glucosinolate sind glycosidische Verbindungen, die in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen in den Pflanzenorganen der Klasse der *Dicotyledoneae*, Familie *Brassicaceae* auftreten. Die Glucosinolate sind eine Stoffgruppe mit mehr als 100 z. Z. bekannten Verbindungen. Sie bestehen chemisch aus einer β-D-Glucoseeinheit, einer mit der Glucose als Thiohydroxamat verknüpften Aglucongruppierung (**R**) und einem Sulfatanion am Hydroxamat-Stickstoff (Ettlinger et al, 1956, Ettlinger et al. 1957). Sie unterscheiden sich nur im Aglucon **R**-, das Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- bzw. Indolstruktur aufweisen kann (Tab. 2). In der intakten Pflanzenzelle liegen diese Verbindungen getrennt von dem endogenen Enzym **Myrosinase** vor. Bei Verletzung der Zellen katalysiert dieses Enzymsystem die Hydrolyse der Glucosinolate unter Produktion verschiedener Verbindungen wie z. B. Thio- (-SCN) und Isothiocyanate (-NCS), Nitrile (-CN), β-D-Glucose und einem Sulfatanion (-HSO₄⁻) (Abb. 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Grundstrukturen der wesentlichsten Glucosinolatgruppen.

$\begin{array}{c} \text{S-Glucose} \\ \\ \text{R}-\text{C} \\ // \\ \text{N}-\text{O}-\text{SO}_3^- \end{array}$ <p>Grundstruktur der Glucosinolate</p>	
Glucosinolate mit Alkenylstruktur (Beispiele):	
Sinigrin	R: CH ₂ = CH -CH ₂ -
Gluconapin	R: CH ₂ = CH -CH ₂ - CH ₂ -
Glucosinolate mit Alkylstruktur (Beispiele):	
Glucoiberin	R: CH ₃ - SO - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ -
Glucoraphanin	R: CH ₃ - SO - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ -
Glucosinolate mit Arylstruktur (Beispiele):	
Glucotropaeolin	R: C ₆ H ₅ -CH ₂ -
Sinalbin	R: C ₆ H ₅ (OH)-CH ₂ -
Glucosinolate mit Indolstruktur (Beispiel):	
Glucobrassicin	R: 

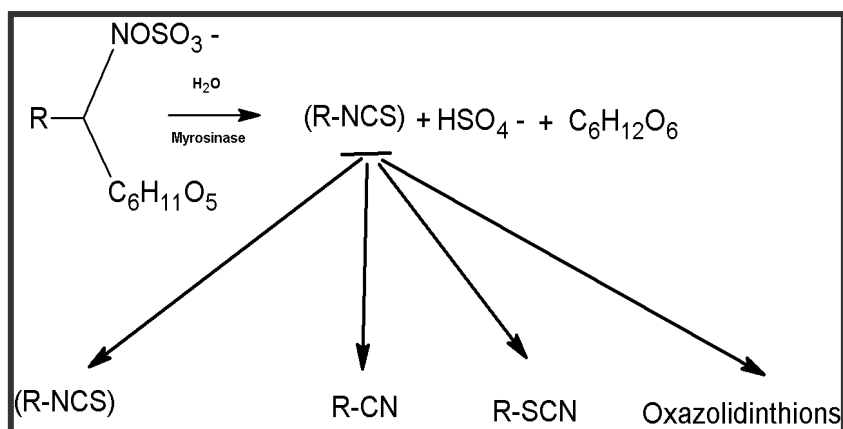


Abb. 2: Schematische Darstellung der Umsetzung von Glucosinolaten unter Myrosinaseeinwirkung zu Thio- bzw. Isothiocyanaten, Nitrilen oder Oxazolidinethionen.

Die Glucosinolate stellen bei Kohlgemüse eine wesentliche, den Geschmack und den ernährungsphysiologischen Wert bestimmende Gruppe von Inhaltsstoffen dar. Auch in der Gruppe der agrotechnisch verwendeten Zwischenfrüchte wie *Brassica juncea*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba* ist die Stoffgruppe der Glucosinolate in teilweise hohen Konzentrationen sowohl in den Samen, als auch in den vegetativen Teilen der Pflanzen vertreten. Die aus den Glucosinolate gebildeten Isothiocyanate und Thiocyanate zeigen z. B. toxische oder besser antinutritive Effekte gegen Insekten oder andere, bodenbürtige Pathogene, so z. B. das aus dem Glucosinolat „Sinigrin“ unter Myrosinaseeinfluss entstehenden Allylisothiocyanat bzw. Allylthiocyanat (Abb. 3).

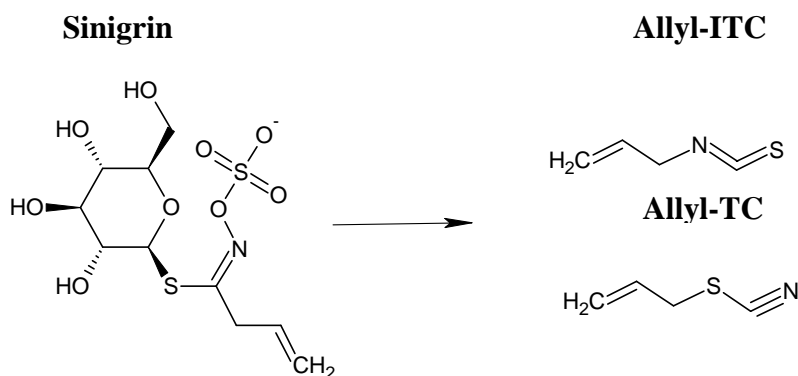


Abb. 3: Schematische Darstellung der Umwandlung von Sinigrin (in Sareptasenf) unter Myrosinaseeinfluss zu Allyl-Isothiocyanat bzw. Allyl-Thiocyanat.

Aber nicht alle in den Pflanzen vorhandenen Glucosinolate bilden unter Myrosinaseeinfluss Isothiocyanate bzw. Thiocyanate. So entsteht z. B. aus dem Glucosinolat „Progoitrin“ **kein** Isothiocyanat, sondern ein Oxazolidinthion, das „Goitrin“, das nicht über die o. g. Eigenschaften verfügt und somit nicht für die Biofumigation relevant ist (Abb. 4). Gleiches gilt auch für die Indolglucosinolate wie z. B. Glucobrassicin (Abb. 5).

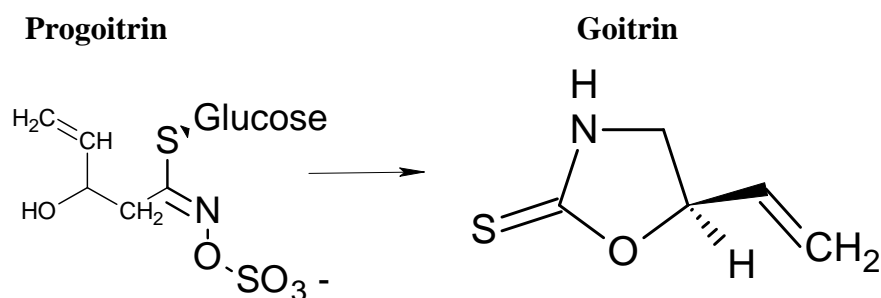


Abb. 4: Schematische Darstellung der Umwandlung von Progoitrin unter Myrosinaseeinfluss zu Goitrin.

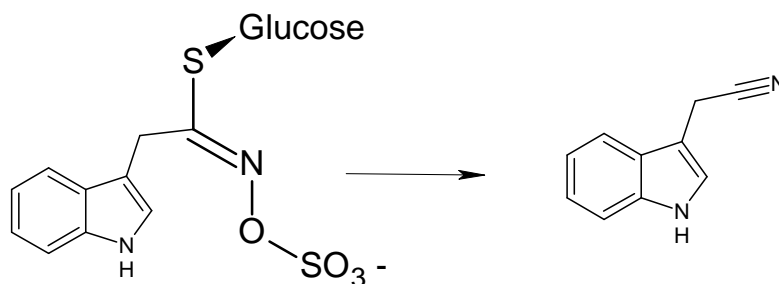
Glucobrassicin**Indol-3-acetonitril**

Abb. 5: Schematische Darstellung der Umwandlung von Glucobrassicin unter Myrosinaseeinfluss zu Indol-3-acetonitril.

Analytik der Glucosinolate

Durch moderne züchtungsbegleitende Analytik ist eine schnelle und effektive Selektion von Kruziferen-Formen mit einem hohen Wirkstoffpotential möglich. Zur Extraktion der Glucosinolate werden jeweils ca. 200 mg des gefriergetrockneten, fein vermahlenden Probenmaterials eingewogen, in einer aufwändigen Prozedur aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und durch das Enzym „Sulfatase“ in die für die Analytik zugänglichen desulfatisierten Verbindungen (Abb. 6) umgewandelt (Schütze et al. 2004).

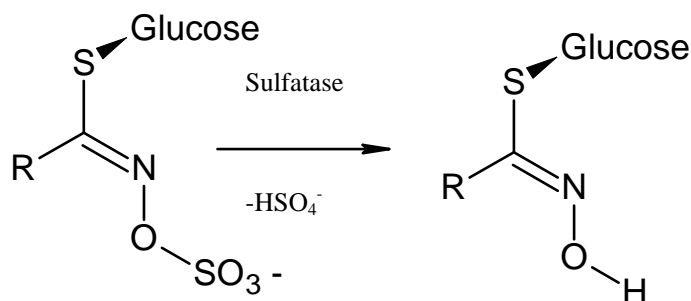


Abb. 6: Umsetzung der Glucosinolate unter Einsatz des Enzyms „Sulfatase“ zu den für die HPLC-Analytik zugänglichen desulfatisierten Verbindungen unter Abspaltung des Sulfatrestes.

Anschließend erfolgt die Untersuchung dieser desulfatisierten Verbindungen unter Einsatz der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit einem sogenannten Multiwellenlängendetektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 229 nm (Abb. 7) in einem Detektionsbereich von 200 – 300 nm. Ein typisches HPLC-Chromatogramm einer *Sinapis alba* – Probe ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abb. 7: HPLC-System „1100“ von Agilent mit automatischem Probengeber, binärer Pumpe und DAD zur Analyse des Glucosinolatgehaltes und des Glucosinolatverteilungsmusters in Brassicaceen.

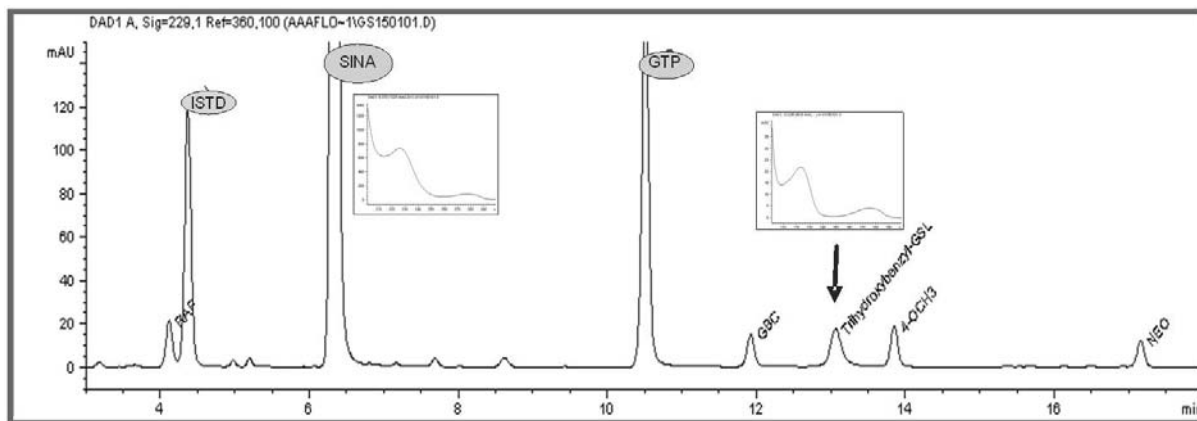


Abb. 8: Typisches HPLC-Chromatogramm einer *Sinapis alba*-Probe mit Sinigrin als „Internen Standard“ (ISTD) und Sinalbin (SINA) als Hauptglucosinolat sowie Glucotropaeolin (GTP) und Trihydroxybenzyl-GSL als weitere Benzyl-Glucosinolate. In nur sehr geringen Konzentrationen vertreten und für das Biofumigationsverfahren nicht relevant treten weiterhin auf: die Indol-Glucosinolate Glucobrassicin (GBC), 4-Methoxyglucobrassicin (4-OCH₃) und Neoglucobrassicin (NEO).

Glucosinolatgehalte und Verteilungsmuster in für die Biofumigation relevanten Kulturarten

Im Ergebnis der Untersuchungen zeigen sich deutliche Einflüsse der Umwelt auf den Gesamtglucosinolatgehalt. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass das Glucosinolatverteilungsmuster **umweltunabhängig** ist. Im Vergleich der Versuchsjahre ist zu sehen, dass der mittlere Glucosinolatgehalt eines Genotyps stark in Abhängigkeit des Standortes (Faktor 3 bis 8) sowie zwischen Einzelpflanzen (Faktor 3 bis 5) schwankt. Beispielhaft ist dies hier für Ölrettich cv. Dacapo (Probenahme im Jahr 2008) gezeigt (Abb. 9). So schwankte der Gesamtgehalt von Einzelpflanzen zwischen 20 und 102 $\mu\text{mol/g TS}$. Bei Ölrettich cv. Contra lagen die Werte zwischen 19 und 85 $\mu\text{mol/g TS}$ (nicht dargestellt). Als Ursache dieser Schwankungen werden in der Literatur neben standortspezifischen Faktoren (Boden, Klima) auch Fragen des Schwefelgehaltes im Boden und der S-Düngung diskutiert (Tab. 1).

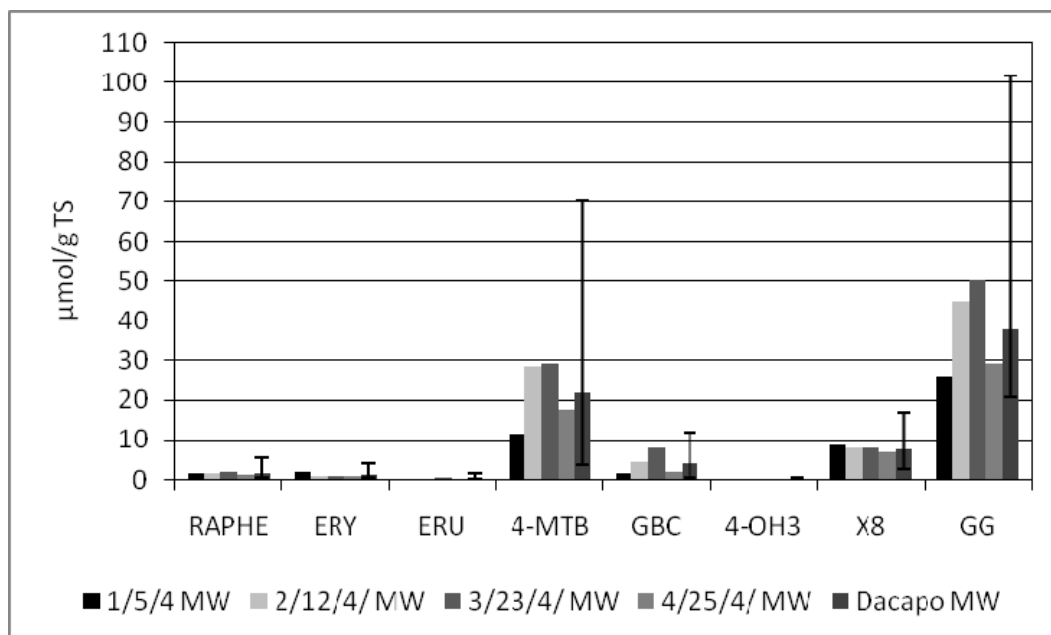


Abb. 9: Variabilität des Glucosinolatgehaltes von Einzelpflanzen: Mittlere Glucosinolatgehalte und Glucosinolat-Verteilungsmuster am Beispiel von Ölrettich cv. Dacapo, Standort Birgel, Rheinland, 4 Wiederholungen a 10 Einzelpflanzen.

Sinapis alba (Weißer Senf)

Das Hauptglucosinolat bei *S. alba* ist das Sinalbin (Abb. 10). Sein Anteil am Glucosinolatgesamtgehalt liegt bei den untersuchten Genotypen, auch in Abhängigkeit vom Anbaujahr sowie Sorte, zwischen 70 und 93%. Als zweithäufigstes Glucosinolat tritt Glucotropaeolin mit relativen Gehalten von bis zu 23% auf. Bei einzelnen Genotypen wurden mittlere Glucosinolatgesamtgehalte bis zu 73 $\mu\text{mol/g TS}$ gemessen, wobei der für die Biofumigation relevante Anteil Werte bis 99% erreichte.

***Brassica juncea* (Brauner Senf/Sareptasenf)**

Das Hauptglucosinolat bei *B. juncea* ist Sinigrin (Abb. 10). Sein Anteil am Glucosinolatgesamtgehalt liegt bei den untersuchten Genotypen zwischen 93 und 98,5%. Der Absolutgehalt erreicht Werte bis 50 $\mu\text{mol/g}$ TS (Freilandanbau). Deutlich geringere Werte (vermindert um 50-75%) wurden bei den gleichen Genotypen bei Anbau im Gewächshaus gemessen.

***Raphanus sativus* (Ölrettich)**

Die Hauptglucosinolate bei Ölrettich sind Raphenin (RAPHE), Erysolin (ERY) und 4-Methylthiobutenyl-GSL (4-MTB), wobei der Hauptanteil durch das 4-MTB gestellt wird (Abb. 10). Der prozentuale Anteil dieser 3 Komponenten am Gesamtglucosinolatgehalt bewegt sich nach bisherigen Untersuchungen zwischen 58 und 82%. Die gemessenen Absolutwerte liegen im Mittel zwischen 20 und 50 $\mu\text{mol/g}$ TS. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zeigen in vielen Fällen eine hohe Variabilität zwischen den Einzelpflanzen, hier am Beispiel des ÖR-Genotyps „Dacapo“ (Probenahme im Jahre 2008) mit der höchsten Variabilität gezeigt (Abb. 9).

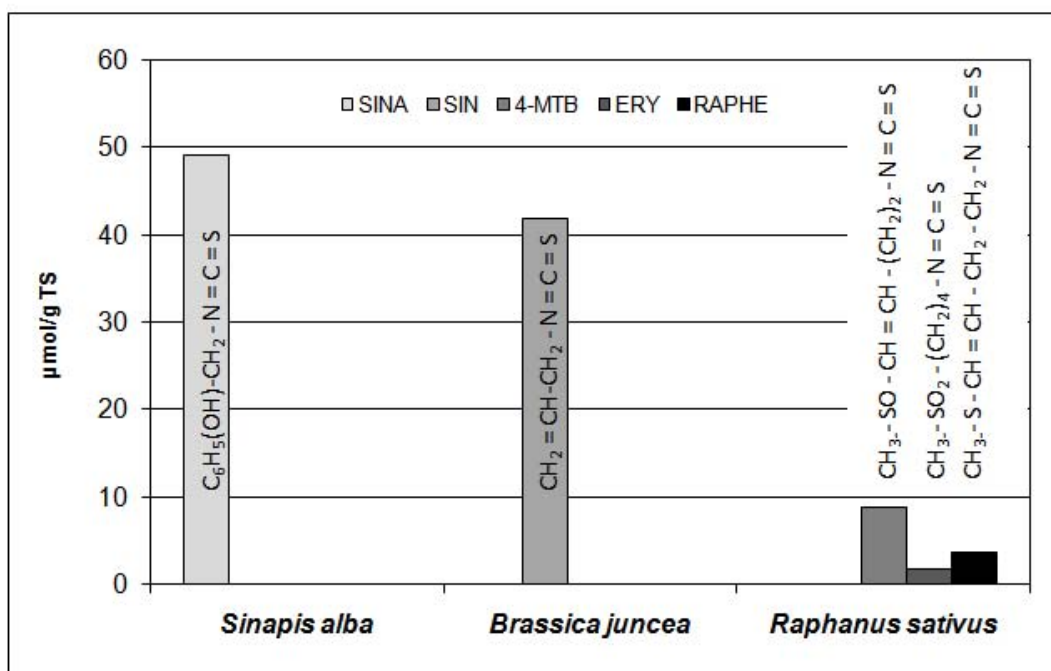


Abb. 10: Übersicht der mittleren Glucosinolatgehalte von *Sinapis alba*, *Brassica juncea* und *Raphanus sativus*, dargestellt an den Hauptglucosinolaten der untersuchten Genotypen. (SINA: Sinalbin, SIN: Sinigrin, 4-MTB: 4-Methylthiobutenyl-Glucosinolat, ERY: Erysolin, RAPHE: Raphenin).

Berechnung des Eintrags an Wirkstoffmenge für die Biofumigation

Für die Einschätzung der Wirksamkeit des Biofumigationsverfahren ist es wichtig, an Hand der gemessenen Glucosinolatgehalte eine Abschätzung über den maximal möglichen Eintrag an Wirkstoff in den Boden treffen zu können. Die nachfolgende Übersicht gibt eine Anleitung für dessen Berechnung (Tab. 3). Dabei dienen die in Tabelle 4 angeführten Molekulargewichte der für die Biofumigation wesentlichen Glucosinolate und Isothiocyanate als Grundlage. Die Berechnung des Eintrags an Wirkstoff für die Biofumigation erfolgte am Beispiel von *Brassica juncea* (angenommen wurde 100% Umsetzung).

Tabelle 3: Anleitung zur Berechnung der Wirkstoffmenge der für das Biofumigationsverfahren wichtigsten Glucosinolate und ihrer Isothiocyanate am Beispiel von Sinigrin.

Angenommener Trockenmasseertrag:	30 dt/ha = 300 g/m ²
Mittlerer GSL-Gehalt pro g TS:	31 µmol Sinigrin
Mittlerer Sinigrin-Gehalt/m ² :	9300 µmol (300 g x 31 µmol)
Molekulargewicht Sinigrin (desulfatisierte Verbindung):	279,3 g/Mol
Menge Sinigrin/m ²	2,597 g/m ² (1 Mol/279,3 g = 0,0093 Mol/x)
Menge Sinigrin/ha	25,975 kg/ha
Molekulargewicht ITC von Sinigrin	99,15 g/Mol
Menge ITC/m ²	0,9221 g/m ²
Menge ITC/ha	9,221 kg/ha

Tabelle 4: Molekulargewichte der für die Biofumigation wesentlichen Glucosinolate und Isothiocyanate.

	Molekulargewicht (g/Mol) Glucosinolate (desulfatis. Verb.)	Molekulargewicht (g/Mol) Isothiocyanate
Sinalbin	345	165,21
Glucotropaeolin	329	149,21
Raphenin	355	175,27
Erysolin	373	193,29
4-MTB	339	159,27
Sinigrin	279	99,15

Zusammenfassung

Der Begriff sowie das Verfahren der „Biofumigation“, zur Beschreibung der suppressiven Wirkung von Kruziferen gegenüber bodenbürtigen Schaderregern, werden erläutert. Auf die dieses System beeinflussenden Faktoren wie pH-Wert des Bodens, Bodentemperatur, Wassergehalt des Bodens, dem/den in der Pflanze vorliegenden Glucosinolat(en) sowie dem Schwefelgehalt des Bodens (S-Düngung) wird eingegangen. Es wird das Prinzip der Umsetzung von Glucosinolaten unter Myrosinaseeinwirkung nach Zerstörung der Pflanzenzellen erläutert und die Bildung bzw. Nichtbildung der für das Biofumigationsverfahren wichtigen Isothiocyanate und Thiocyanate an Hand von Beispielen dargestellt. Die Variabilität des Glucosinolatgehaltes und des Glucosinolat-Verteilungsmusters bei den schwerpunktmäßig untersuchten Genotypen von Weißer Senf, Ölrettich und Sareptasenf werden diskutiert. Vorgestellt wird eine moderne züchtungsbegleitende HPLC-Analytik für eine schnelle und effektive Selektion von Kruziferen-Formen mit einem hohen Wirkstoffpotential. Es wird die Vorgehensweise erläutert, um an Hand der gemessenen Glucosinolatgehalte eine Abschätzung über den maximal möglichen Eintrag an Wirkstoff (Isothiocyanat bzw. Thiocyanat) in den Boden treffen zu können.

Literatur

Kirkegaard J.A., Gardner P.A., Desmarchelier J.M., Angus J.F. (1993). Biofumigation – using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In: N. Wratten,

- R.J. Mailer (Eds) Proceedings 9th Australian Research Assembly on Brassicas. Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, S. 77-82.
- Brown P.D., Mora M.J. (1997). Control of soilborne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy* 61: 167-231.
- Kirkegaard J.A., Matthiesen J.N. (2004). Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* 3: 233-239.
- Lazzeri L., Manici L. M. (2000). The glucosinolate-myrosinase system: A natural and practical tool for biofumigation. In: Proceedings of IS Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Desinfestation. M. L. Gullino, J. Karan, A. Matta (Eds). *Acta Horticulturae* 532: 89-95.
- Lazzeri L., Leoni O., Bernardi R., Malaguti L., Cinti S. (2004). Plants, techniques and products for optimising biofumigation in the full field. *Agroindustria* 3: 281-287.
- Matthiessen J.N., Kirkegaard J.A. (2006). Biofumigation and enhanced biodegradation: Opportunity and challenge in soilborne pest and disease control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 235-265.
- Walker J.C., Morell S., Foster H. (1937). Toxicity of mustard oils and related sulphur compounds to certain fungi. *American Journal of Botany* 24: 536-541.
- Falk K. L., Tokuhisa J. G., Gershenzon J. (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9: 573-581.
- Ettlinger M.G., Lundeen A.J. (1956). The structure of sinigrin and sinalbin: an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* 78: 4172.
- Ettlinger M.G., Lundeen A.J. (1956). First synthesis of a mustard oil glucoside: the enzymatic Lossen rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* 79: 1764-1765.
- Schütze W., Quilitzsch R., Schlathölter M. (2004). Glucosinolate testing of leaves and stems in brassicas with HPLC and MIR. *Agroindustria* 3: 399-401.