

Die Glucosinolate der Brassicaceen - ein Potential für den biologischen Pflanzenschutz

The glucosinolates of Brassicas – a potential of biological plant protection

Wolfgang Schütze

Julius Kühn-Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz,
Erwin-Baur-Str. 27, D-06484 Quedlinburg
wolfgang.schuetze@jki.bund.de, +49(0)3946 47304

DOI: 10.5073/jka.2012.436.022

Zusammenfassung

Im Rahmen von HPLC-Untersuchungen wurden mehrere hundert Genotypen der Familie der Brassicaceen auf ihren Gehalt an Glucosinolaten (GSL) im Blattmaterial, in den Wurzeln und im Samen untersucht (Einzelpflanzen / Mischproben in Doppelbestimmung). Das Screening hatte das Ziel, interessantes Material im Hinblick auf seine Eignung zur pflanzenbauliche Verwendung als Zwischenfrüchte für den biologischen Pflanzenschutz (Biofumigation) zu selektieren (Genotypen mit hohem Gehalt an Isothiocyanat (ITC) - bildenden GSL). Für das Biofumigationsverfahren war die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Genotypen ungeeignet, da der Glucosinolatgehalt vieler Genotypen zu gering war und sie deshalb nicht mit den derzeit im Anbau befindlichen Sorten bzw. Stämmen konkurrieren können, bzw. die enthaltenen GSL keine ITC bilden. Aussichtsreich scheint die Suche nach leistungsfähigen Formen im Genbankmaterial von *Brassica juncea*, *Sinapis alba*, *Bunias orientalis* und *Raphanus sativus*. Der Einsatz von Kreuzblütlern für den „biologischen Pflanzenschutz“ ist ein innovatives und viel versprechendes Verfahren zur Bekämpfung bodenbürtiger Schaderreger in gemäßigten Klimaregionen, das zudem kostengünstig in die gängige Praxis integriert werden kann.

Stichwörter: Brassicaceen, Biofumigation, Glucosinolate, Isothiocyanate, HPLC

Abstract

In the context of HPLC-analysis some hundred genotypes of the Brassica family were analysed for their content of glucosinolates (GSL) in leaf material, roots and seeds (single plants / mixed samples in repeat determination). The aim of the screening was to select and find interesting material for the development as catch crop for biological plant protection (biofumigation), i. e. plants with a high content of glucosinolates which can produce isothiocyanates (ITC). For the biofumigation procedure most Brassica forms were unsuitable, because their glucosinolate content was too low or the glucosinolates could not generate ITC. Promising seems the search of efficient forms in gene bank material of *Brassica juncea*, *Sinapis alba*, *Bunias orientalis* and *Raphanus sativus*. The use of cruciferous plants for biological plant protection is an innovative and promising technique for the combat of soil-borne pests in temperate climate area, which can be integrated cost-effectively into the practice.

Keywords: Brassicas, biofumigation, glucosinolates, isothiocyanates, HPLC

Einleitung

Zur Familie der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae) gehören etwa 170 Gattungen mit etwa 2.000 Arten [Ordnung Kreuzblütenartige (Brassicales) – Familie Kreuzblütengewächse].

Durch viele Kulturpflanzen innerhalb der Familie sind sie von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Kreuziferen enthalten Glucosinolate. Dies sind glycosidische Verbindungen, die in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen in den einzelnen Pflanzenorganen auftreten. Es handelt sich um eine schwefelhaltige 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. Werden die Zellwände von Kreuziferenpflanzen zerstört, kommt es unter dem Einfluss des Enzyms Myrosinase zu deren Umsetzung. Je nach Ausgangsverbindungen kommt es zur Freisetzung physiologisch aktiver Thio- bzw. Isothiocyanate, Nitrile oder

Oxazolidinthione. Die toxische Wirkung der ITC gegen bodenbürtige Pflanzenschädlinge ist seit langem bekannt (WALKER *et al.*, 1937). Von KIRKEGAARD *et al.* wurde 1993 für eine spezielle Form des biologischen Pflanzenschutzes der Begriff „Biofumigation“ zur Beschreibung der suppressiven Wirkung von Kreuzifern gegenüber bodenbürtigen Schaderregern eingeführt. Einige der Glucosinolate (Indolglucosinolate, Glucoraphanin) sind andererseits auf Grund ihres antikanzerogenen Potentials interessant für eine gesunde Ernährung.

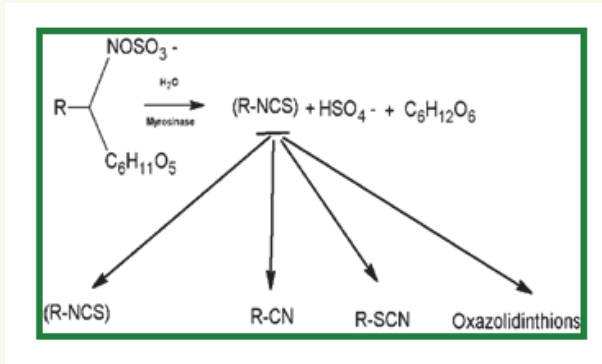


Abb. 1 Spaltungsschema der Glucosinolate nach Zerstörung der Pflanzenzellen unter Einfluss des pflanzeigenen Enzyms „Myrosinase“ (nach C. H. VAN ETTEN *et al.*)

Fig. 1 Partition procedure of glucosinolates after plant cell deletion below the influence of plant enzyme myrosinase (on C. H. VAN ETTEN *et al.*)

Material und Methode

Durch moderne züchtungsbegleitende Analytik ist eine schnelle und effektive Selektion von Kreuzifern-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 HPLC-Analytik zugänglichen desulfatisierten Verbindungen umgewandelt (SCHÜTZE *et al.*, 2004; PETERKA *et al.*, 2004). Für die Untersuchungen wurden sowohl konventionelle Sorten von *Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Rapanus sativus* als auch Genbankmaterial aus dem IPK Gatersleben sowie aus dem VIR St. Petersburg eingesetzt.

Ergebnisse

Die überwiegende Mehrzahl der untersuchten Genotypen war für das Biofumigationsverfahren ungeeignet, da einerseits ihr Glucosinolatgehalt zu gering war und sie deshalb nicht mit den derzeit im Anbau befindlichen Sorten bzw. Stämmen konkurrieren können, andererseits zwar höhere Glucosinolatgehalte auftreten, diese Verbindungen aber auf Grund ihrer Struktur kein ITC bilden (PRO, EPRO, GNL, Indolglucosinolate). Unter diesen Aspekten haben u. a. *Eruca*, *Camelina*, Formen von *Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Crambe*, *Barbarea* oder verschiedene Formen von *Lipidium* (Abb. 2) keine Bedeutung für das Biofumigationsverfahren (Blattmaterial).

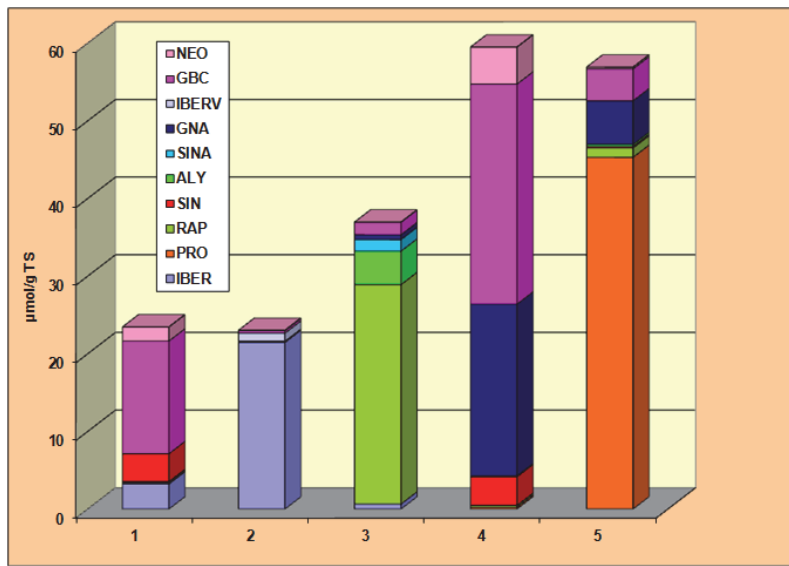


Abb. 2 1-*Brassica incana*, 2-*Brassica tournefortii* Gouan., 3-*Brassica villosa*, 4-*Brassica cretica*, 5-*Brassica insularis* – Genbankmaterial aus dem VIR St. Petersburg (Russland) mit teilweise sehr hohem GSL-Gesamtgehalt. Auf Grund der Struktur der Hauptkomponenten sind sie teilweise geeignet als Ausgangsmaterial für die Züchtung von Formen mit einem hohen Potential für die gesunde Ernährung (1, 4 – hoher Gehalt an Indol - GSL, 3 – hoher Gehalt an Glucoraphanin) [ALY-Alyssin; GBC-Glucobrassicin, GNA-Gluconapin, IBER-Glucoiberin, IBERV-Glucoiberiverin, NEO-Neoglucobrassicin, PRO-Progoitrin, RAP-Glucoraphanin, SINA-Sinalbin, SIN-Sinigrin].

Fig. 2 1-*Brassica incana*, 2-*Brassica tournefortii* Gouan., 3-*Brassica villosa*, 4-*Brassica cretica*, 5-*Brassica insularis* – gene bank material from the VIR St. Petersburg (Russia) with partially high contents of glucosinolates. Based on the main component structure they are partially suitable as basic material for breeding of forms with a high potential of healthy nutrition (1, 4 – high content of indole - GSL, 3 – high content of glucoraphanine) [ALY-allyssine; GBC-glucobrassicine, GNA-gluconapine, IBER-glucoiberine, IBERV-glucoiberiverine, NEO-neoglucobrassicine, PRO-progoitrine, RAP-glucoraphanine, SINA-sinalbine, SIN-sinigrine].

Aussichtsreich scheint dagegen die Suche nach leistungsfähigen Formen im Genbankmaterial von *Brassica juncea*, *Sinapis alba*, *Bunias orientalis* und *Raphanus sativus*. Interessant ist auch der extrem hohe Glucosinolatgehalt in den Wurzelknollen von *Lepidium meyenii* von über 200 µmol/g TS, überwiegend Glucotropaeolin (Abb. 3). Hier sind jedoch die Fragen der Anbaubedingungen und der Verfügbarkeit der Glucosinolates für das Biofumigationsverfahren völlig offen.

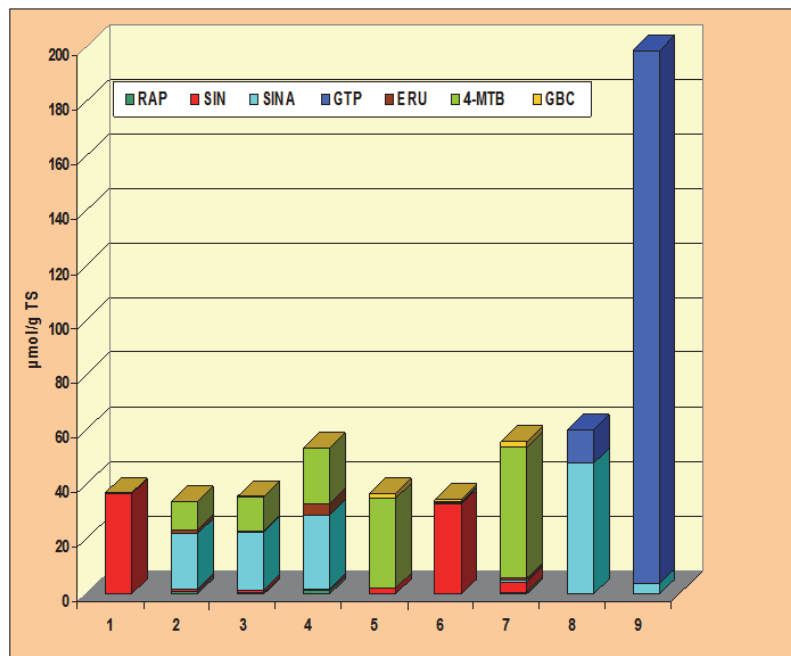


Abb. 3 1 - Brauner Senf (*B. juncea*), 2-4 - *Bunias orient.* (Zackenschötchen), 5 - *Raphanus sativus*, 6 - *Brassica oleracea*, 7- *Raphanus sativus*, 8-*Sinapis alba*, 9 - *Lepidium meyenii* (Wurzel) – Genbankmaterial bzw. Stämme, die auf Grund ihres GSL-Verteilungsmusters für das Biofumigationsverfahren geeignet sind, da die Haupt-GSL ITC bilden. (RAP-Raphanin, SIN-Sinigrin, SINA-Sinalbin, GTP-Glucotropaeolin, ERU-Glucoerucin, 4-MTB-Gluoraphasatin, GBC-Glucobrassicin (Indol-GSL))

Fig. 3 1 - Indian mustard (*B. juncea*), 2-4 - *Bunias orient.*, 5 - *Raphanus sativus*, 6 - *Brassica oleracea*, 7- *Raphanus sativus*, 8-*Sinapis alba*, 9 - *Lepidium meyenii* (root) – gene bank material respectively strains, based on here GSL-distribution pattern adapted for the biofumigation process – the main glucosinolates forms ITC. (RAP-raphanine, SIN-sinigrine, SINA-sinalbine, GTP-gluco tropaeoline, ERU-glucoerucine, 4-MTB-gluoraphasatine, GBC-gluco brassicine (indole-GSL))

Nach bisher vorliegenden einjährigen Versuchsergebnissen zum Einfluss der Aussaatdichte (Pfl./m²) deuten sich für die untersuchten *Sinapis alba* – und *Brassica juncea* – Genotypen bei einer Pflanzdichte von 300 Pfl./m² ein Optimum im Glucosinolatgehalt an. Es scheint auch ein sortenspezifisches Verhalten „Pflanzen/m² - Glucosinolatgehalt“ vorzuliegen (Abb. 4).

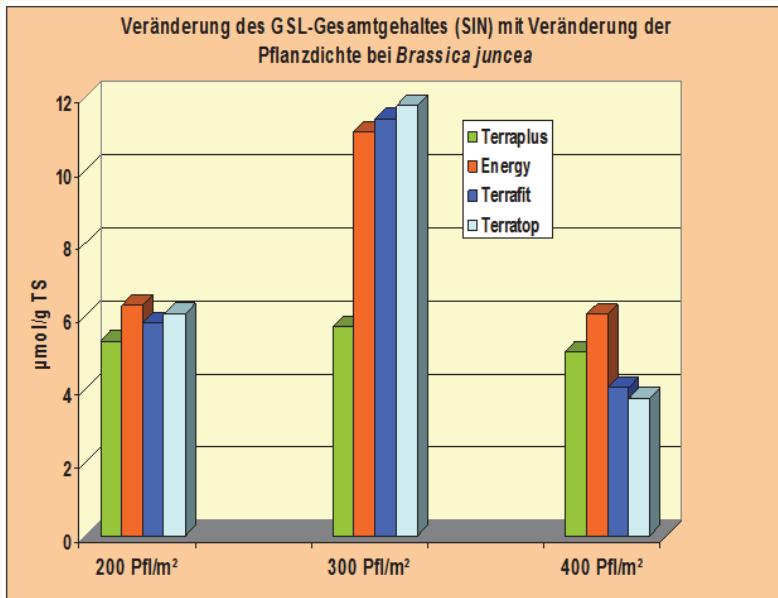


Abb. 4 Einfluss der Aussaatdichte (Pflanzen/m²) auf die Höhe des Gehaltes der Hauptkomponente Sinigrin (SIN) – bis zu 99 % des Gesamtgehaltes – am Beispiel von *Brassica juncea*-Genotypen.

Fig. 4 Influence of sowing concentration (plants/sqm) on the quantity of glucosinolates (main compound sinigrine) – up to 99 % of the total content – using the example of *Brassica juncea*-genotype.

Weiterhin deutet sich auch eine gegenseitige Beeinflussung im GSL - Gehalt bei Mischungen zwischen *Brassica juncea* und *Raphanus sativus*, untersucht am Beispiel unterschiedlicher Mischungsverhältnisse zwischen Sareptasenf „Terraplus“ und Ölrettich „Defender“ an (o. Abb.). Für eine Bestätigung sind weitere Untersuchungen über mehrere Vegetationsperioden erforderlich. Genotyp bedingt wurden sehr große Glucosinolatgehaltsdifferenzen (bis zu 80 µmol/g TS) zwischen Einzelpflanzen gemessen. Auch im Feldwiederholungsanbau zeigten sich große Gehaltsunterschiede, dargestellt am Beispiel von Ölrettich „Dacapo“ (Abb. 5), angebaut am Standort Birgel (Rheinland-Pfalz).

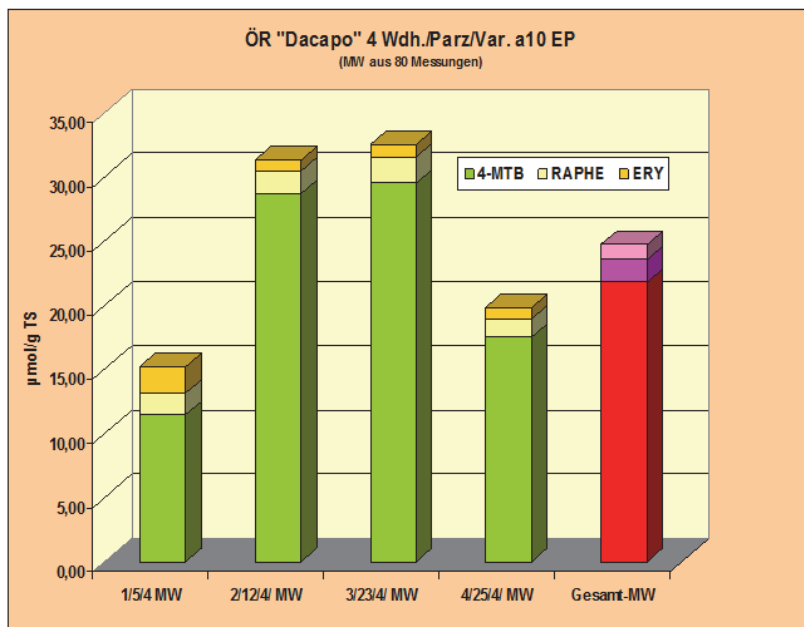


Abb. 5 Variabilität der für die Biofumigation relevanten Einzelverbindungen 4-Methylthiobutenyl-GSL (4-MTB), Erysolin (ERY) und Raphenin (RAPHE) und des Gesamtgehaltes am Beispiel von *Raphanus sativus* (Dacapo) im Feldwiederholungsanbau. Der Gesamtgehalt der Einzelpflanzen variierte zwischen 20,8 und 101,7 µmol/g TS.

Fig. 5 Variability of single compounds - relevant for the biofumigation procedure (4-methylthiobutenyl-GSL (4-MTB), erysoline (ERY) and raphenine (RAPHE) and the total content) using the example of *Raphanus sativus* (Dacapo) in field repetition cultivation. The total content of single plants varied between 20.8 and 101.7 µmol/g dm.

Durch weitere züchterische Bearbeitung, z. B. durch Einbeziehung von Genbankmaterial mit hohem Glucosinolatgehalt, einem anderen Glucosinolatverteilungsmuster und Selektion geeigneter Varianten ist mit einer deutlichen Verbesserung der Biofumigationswirkung und somit für den biologischen Pflanzenschutz zu rechnen. Die nachfolgende Übersicht gibt eine Anleitung zur Berechnung des maximalen Wirkstoffeintrages bei einem 100 %-igen Umsatz der Glucosinolate zum entsprechenden ITC am Beispiel von Sinigrin.

Berechnung des Eintrags an Wirkstoffmenge für die Biofumigation

Angenommener Trockenmasseertrag:	30 dt/ha = 3000 kg/10.000m ² = 300 g/m ²
Mittlerer GSL - Gehalt pro g TRM (TS):	31 µmol Sinigrin
Mittlerer SIN-Gehalt/m ² :	9300 µmol (300 g x 31 µmol)
Molekulargewicht Sinigrin: (desulfatisierte Verbindung)	279,3 g/Mol
Menge Sinigrin/m ² (in g):	2,597 g/m ² (1Mol/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 (angenommen 100 % Umsatz)

Molekulargewichte zur Berechnung der Wirkstoffmenge der für das Biofumigationsverfahren wichtigsten GSL und ihrer ITC

	Molekulargewicht m/z (desulfatis. Verb.)	Molekulargewicht m/z (ITC)
Sinialbin	345	165,21
Glucotropaeolin	329	149,21
Raphenin	355	175,27
Erysoin	373	193,29
4-MTB	339	159,27
Sinigrin	279	99,15

Der Einsatz von Kreuzblütlern für die „biologischen Pflanzenschutz“ ist ein innovatives und viel versprechendes Verfahren zur Bekämpfung bodenbürtiger Schaderreger in gemäßigten Klimaregionen, das zudem kostengünstig in die gängige Praxis integriert werden kann.

Danksagung

Das Material für die Untersuchungen wurde freundlicherweise bereitgestellt durch das VIR St. Petersburg (Frau Dr. A. Artemyeva), dem IPK Gatersleben (Frau Dr. U. Lohwasser) sowie von der Fa. P.H. Petersen Saatucht Lundsgaard (Frau M. Schlathölter); in Zusammenarbeit mit Dr. M. Daub (A, Elsdorf), Dr. J. Hallmann (EP, Münster).

Literatur

ETTLINGER, M. G. und A. J. LUNDEEN, 1956: The structure of sinigrin and sinialbin; an enzymatic rearrangement. J. Amer. Chem. Soc. **78**, 4172.

ETTLINGER, M. G. und A. J. LUNDEEN, 1957: First synthesis of a mustard oil glucoside: the enzymatic lossen rearrangement. J. Amer. Chem. Soc. **79**, 1764.

H. VAN ETTEN et al., 1980: Glucosinolates: Potential Toxicants in cabbage Cultivares. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **105**(5), 710-714.

KIRKEGAARD, J. A., P. A. GARDNER, J. M. DESMARCHELIER und J. F. ANGUS, 1993: Biofumigation – using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In: N. Wratten, R.J. Mailer (Hrsg.) Proceedings 9th Australian Research Assembly on Brassicas. Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, 77-82.C.

PETERKA, H., H. BUDAHN, O. SCHRADER, R. AHNE und W. SCHÜTZE, 2004: Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*Brassica napus*) by monosomic chromosome addition. Theor. Appl. Genet. **109** (1), 30-41.

SCHÜTZE, W., R. QUILTSCH und M. SCHLATHÖLTER, 2004: Glucosinolate testing of leaves and stems in brassicas with HPLC and mid IR spectroscopy Agroindustria **3** (3), 399-401.

WALKER, J.C., S. MORELL und H. FOSTER, 1937: Toxicity of mustard oils and related sulphur compounds to certain fungi. Am. J. Bot. **24**, 536-541.