

## Keimung, Auflaufen und Pyrrolizidinalkaloid-Gehalte von Gemeinem Kreuzkraut (*Senecio vulgaris*)

*Germination, emergence and pyrrolizidine-contents of common groundsel (Senecio vulgaris)*

Sabine Gruber<sup>1\*</sup>, Pia Stoll<sup>1</sup>, Sabine Zikeli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universität Hohenheim, Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Fg. Allgemeiner Pflanzenbau (340a), Fruwirthstr. 23, 70599

<sup>2</sup>Universität Hohenheim, Institut für Kulturpflanzenwissenschaften, Koordination für ökologischen Landbau und Verbraucherschutz (340d), Fruwirthstr. 14-16, 70599 Stuttgart

\*Korrespondierende Autorin, Sabine.Gruber@uni-hohenheim.de

DOI 10.5073/jka.2018.458.065



### Zusammenfassung

Die Aufnahme von Gemeinem Kreuzkraut (*Senecio vulgaris*) über Lebensmittel kann wegen des Gehalts an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) zu gesundheitlichen Schäden führen. Daher werden pflanzenbauliche Ansätze gesucht, um Beimischungen mit *S. vulgaris* zu vermindern. In Klimaschränken wurde der Einfluss von Temperatur und Lichtverhältnissen sowie einer vorgeschalteten Einwirkung von Frost oder Trockenstress auf das Keimvermögen von *S. vulgaris* geprüft. Weiterhin wurden im Sommer 2016 vier Sätze von *S. vulgaris* auf der Versuchsstation Kleinhohenheim, Stuttgart, ausgesät, um den PA-Gehalt in den verschiedenen Pflanzenteilen und zu verschiedenen Jahreszeiten zu analysieren. Bei Licht und ohne Vorbehandlung keimten die Samen bei 5 °C, 10 °C und 20 °C zu 84 bis 87 %, im Dunkeln lagen die Werte etwas darunter. Eine Vorbehandlung mit Frost führte bei anschließender Keimtemperatur von 5 °C zu signifikant mehr ungekeimten, intakten Samen (75 %) gegenüber der Kontrolle (20 %) oder der Variante mit Trockenstress (8 %). Die Blüten von *S. vulgaris* enthielten bis zu 7600 mg PA/kg in der luftgetrockneten Biomasse und damit signifikant höhere PA-Summengehalte ( $\Sigma$  Retrorsin, Senecionin, Seneciphyllin, Senecivernin sowie deren korrespondierende N-Oxide) als Stängel und Blätter. Mit späterer Saatzeit stieg der Gehalt an PA in Blättern signifikant. PA-Gehalte in Nutzpflanzen durch Kontamination mit *S. vulgaris* könnten effektiv reduziert werden, wenn keine Blüten in das Erntegut gelangten. Niedrige Temperaturen und Frost scheinen die unerwünschte Samenüberdauerung von *S. vulgaris* zu fördern. Unter diesem Gesichtspunkt sind Blütenbildung und Aussamen gegen Ende der Vegetationsperiode besonders kritisch. Späte Ernteschritte von Heil- und Gewürzpflanzen oder Schnittsalaten sind zu vermeiden, um Blüten- und Samenbildung von *S. vulgaris* kurz vor dem Winter einzuschränken, und um Beimischungen mit saisonal erhöhten PA-Gehalten zu verhindern.

**Stichwörter:** Dormanz, Greiskraut, Keimung, PA-Gehalte, Samen

### Abstract

The uptake of food contaminated with common groundsel (*Senecio vulgaris*) is a considerable health risk because of the occurrence of pyrrolizidine alkaloids (PA) in parts of the plant. Agronomical approaches are needed to minimize potential contamination with *S. vulgaris*. Different temperatures, light conditions and seed pre-treatments were tested during the germination of *S. vulgaris* to identify the optimum environment for germination. In addition, four sets of *S. vulgaris* were sown in a field trial at the research station Kleinhohenheim/South West Germany in 2016 to determine the PA pattern and any shift in PA contents in during the year in flowers, leaves and stems. Germination rates were highest (84-87%) when seeds germinated in light without pre-treatment, and a little lower in darkness, at any of the three trial temperatures of 5 °C, 10 °C and 20 °C. Pre-treatment with frost, particularly in combination with cool germination temperatures, lead to significantly higher numbers of intact, ungerminated seeds (75%) compared to the control (20%) or a drought stress pre-treatment (8%). Flowers of *S. vulgaris* contained up to mg total PA/kg in the air dried plant material ( $\Sigma$  of retrorsine, senecionine, seneciphylline, senecivernine and their corresponding N-oxides) and thus the contents were significantly higher than those in stems or leaves. The PA content in leaves increased significantly during the season. As flowers seem to be the main source of PA, their removal or avoidance in harvested crops is most desired. For avoidance of seed production before winter (with risk of seed persistence due to cold temperatures), herbs and medical plants or lettuce contaminated with *S. vulgaris* should not be harvested in late summer or autumn. This approach would additionally avoid contamination with *S. vulgaris* with increased PA contents in the harvested product at the end of the season.

**Keywords:** Dormancy, old-man-in-the-spring, pyrrolizidine alkaloids, seed

## Einleitung

Unkräuter aus der Gattung *Senecio* haben in den letzten Jahren wegen ihres vermehrten Auftretens und ihrer Gehalte an toxischen Pyrrolizidinalkaloiden (PA) im Grünland und im Ackerbau an Aufmerksamkeit gewonnen. Die Toxizität hängt von der Pflanzenart, dem Pflanzenorgan und den äußeren Bedingungen ab (HARTMANN und ZIMMER, 1986; KIRK et al., 2010). Nutztiere nehmen PA häufig durch mit *Senecio jacobea* vermischtem Futter auf, während es in der menschlichen Nahrung beim Konsum von Salaten, Tees oder Kräuterteemischungen, die mit dem Ackerunkraut *Senecio vulgaris* (Gemeines Kreuzkraut) verunreinigt sind, zu ungewollten und hohen Aufnahme von PA kommen kann (BFR 2007, 2013; WIEDENFELD und EDGAR, 2011). *S. vulgaris* war in einer Studie auf Anbauflächen von Heil- und Gewürzpflanzen (60 Flächen mit Kamille, Petersilie, Melisse oder Pfefferminze) in Deutschland auf rund der Hälfte der Flächen vertreten und das am häufigsten aufgefundene PA-haltige Unkraut (PLESCHER et al., 2016). Die Dynamik der Keimung von *S. vulgaris* wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt. Die Pflanze wird überwiegend als Lichtkeimer beschrieben, die dennoch aus mehreren Zentimetern Bodentiefe keimen kann (HILTON, 1983; SÖCHTING und ZWERGER, 2014); andere Studien zeigen die Fähigkeit, auch in Dunkelheit in deutlichem Umfang zu keimen (LUTMAN et al., 2008). Weiterhin scheinen die Umgebungstemperaturen einen Einfluss auf Keimung und Dormanzzyklen zu haben (FIGUEROA et al., 2007). Über den Gehalt an PA und deren Zusammensetzung in einzelnen Pflanzenteilen sowie über eine mögliche Veränderung der PA-Gehalte im Jahresverlauf auflaufender Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Zur Entwicklung und Verbesserung von Bekämpfungsstrategien von *S. vulgaris*, insbesondere im Heil- und Gewürzpflanzenanbau, müssen verstärkt Informationen zur Physiologie der Pflanzen gewonnen werden, um Kontaminationen zu verhindern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, günstige sowie hemmende Bedingungen für die Keimung und das Auflaufen von *S. vulgaris* zu identifizieren. Weiterhin wurden die PA-Gehalte in verschiedenen Pflanzenteilen abhängig vom Auflaufen während der Vegetationsperiode bestimmt. Dazu wurden Versuche im Labor und im Freiland durchgeführt.

## Material und Methoden

Die Studie umfasste einen Keimtest im Klimaschrank bei verschiedenen Umweltbedingungen und einen Feldversuch mit vier Aussaatzeitpunkten von *S. vulgaris* während der Vegetationsperiode und anschließender Analytik der Pyrrolizidinalkaloide (PA) in Blüten, Blättern und Stängeln.

Der Keimtest wurde am 03.05.2016 mit den Faktoren Vorbehandlung (Trockenstress, Frost, Kontrolle), Lichtverhältnisse (Licht oder Dunkelheit) sowie Temperatur (5 °C, 10 °C, 20 °C) angelegt. Die Samen für den Keimtest stammten aus einer Wildsammlung der Firma Pharmaplant im Jahr 2015. Sie wurden unmittelbar vor Beginn der Keimtests einer Vorbehandlung unterzogen und dabei entweder bei -20 °C für sieben Tage eingefroren, einem Trockenstress durch Behandlung mit PEG nach WEBER et al. (2010) ausgesetzt, oder bei Raumtemperatur bis zum Keimtest gelagert (Kontrolle). Je Faktorenkombination wurden dreimal 100 Samen auf Petrischalen mit Filterpapier und Zugabe von 4 ml Wasser verteilt und bei Licht oder Dunkelheit für drei Wochen in Keimschränke mit der entsprechenden Temperatur gestellt. Gekeimte und verdorbene Samen wurden täglich gezählt und entfernt. Am Ende des Versuchs wurden die intakten, ungekeimten Samen erfasst.

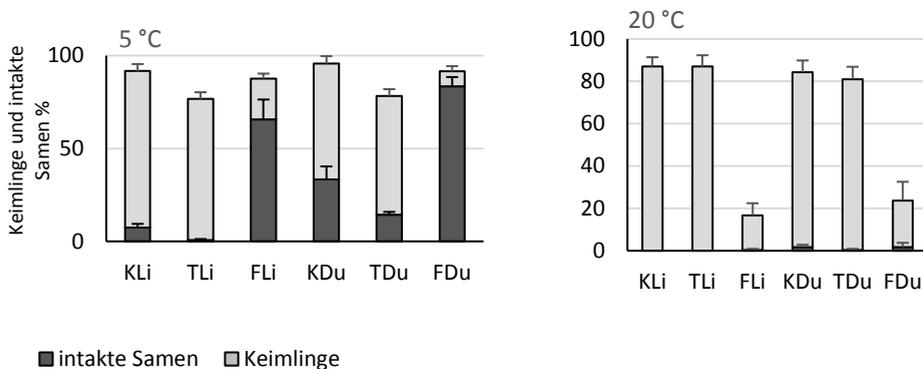
Der Feldversuch fand vom 22.06.2016 bis zum 15.11.2016 auf der Versuchsstation Agrarwissenschaften, Standort Kleinhohenheim (Ökologischer Landbau) der Universität Hohenheim, Stuttgart, statt. Die Aussaat erfolgte von Hand in Kleinparzellen (Bodenart IT, vier Wiederholungen) von 0,4 m × 0,5 m als Samen/Sandgemisch, gestaffelt am 22.06.2016, 20.07.2016, 15.08.2016 und 12.09.2016, mit einer Saatstärke von 100 Samen pro Reihe und einem Reihenabstand von 20 cm (zwei Reihen je Parzelle). Das Saatgut stammte aus einer Wildsammlung im März und April 2016 auf dem Campus der Universität Hohenheim. Im Keimtest über 20 Tage bei 20°C und Licht betrug die Keimfähigkeit dieser Samen 77 %. Von jeder Kohorte wurden zum jeweiligen Blütezeitpunkt Blüten, Blätter und Stängel geerntet. Die Pflanzenteile wurden bei 40 °C

72 Stunden getrocknet („Lufttrockenmasse“, LTM), bei der Firma Pharmaplant auf eine Partikelgröße von < 20 µm vermahlen, und die Proben dann für die Analytik zur Firma PhytoLab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland) versandt. Die Extraktion der PA erfolgte aus jeweils 2 g gemahlenem Probenmaterial mit 25 ml Methansäure. Die PA wurde mittels Flüssigchromatographie in Kombination mit Massenspektroskopie nach der Methode von NOWAK et al. (2016) bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte über das Programm SAS University Edition und der Prozedur ANOVA. Sofern für die Varianzhomogenität erforderlich, erfolgte eine log-Transformation der Daten.

## Ergebnisse

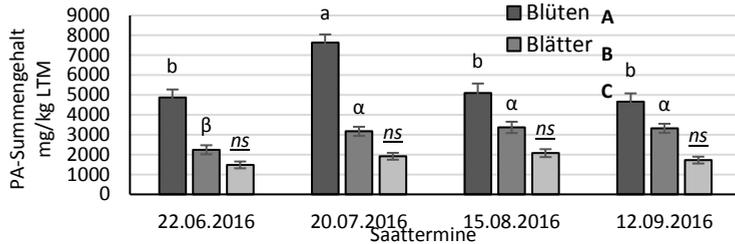
Die höchsten Keimraten von *S. vulgaris* fanden sich bei allen Temperaturen in den Varianten ohne Vorbehandlung (Kontrolle) und bei Licht, mit Werten zwischen 84 % und 87 % (Abb. 1; 10 °C nicht dargestellt). Im Dunkeln lagen die Keimraten ohne Vorbehandlung zwischen 62 % (5 °C) und 83 % (20 °C). Während die Samen bei 10 °C und 20 °C sowohl bei Licht als auch bei Dunkelheit in der Kontrolle und bei vorherigem Trockenstress gleichermaßen zu über 80 % keimten, erhöhte die Vorbehandlung mit Frost bei Keimtemperaturen von 5 °C die Anzahl ungekeimter und dabei sensorisch intakter Samen signifikant im Mittel über alle Versuchsfaktoren (nicht dargestellt). Hier blieben im Mittel 75 % der Samen ungekeimt, gegenüber 20 % in der Kontrolle und 8 % nach vorherigem Trockenstress. Der größte Anteil Samen (84 %) blieb intakt und ungekeimt, wenn eine Frostvorbehandlung erfolgte und die Samen anschließend bei 5 °C im Dunkeln gehalten wurden. Dies stellt gegenüber der Variante 5 °C/Dunkelheit ohne Vorbehandlung eine Steigerung um den Faktor 2,5 dar. Die Differenz der Summe von Samen plus Keimlinge zu den ausgelegten 100 Samen ist auf verdorbene Samen zurückzuführen.

Im Feldversuch wiesen die Blüten von *S. vulgaris* mit bis zu 7600 mg PA/kg lufttrockene Biomasse signifikant höhere Gehalte an PA auf (Σ Retrorsin, Senecionin, Seneciophyllin, Senecivernin sowie deren korrespondierender N-Oxide) als Blätter oder Stängel (Abb. 2). Der PA-Gehalt stieg in Blättern leicht aber signifikant bei den später in der Vegetationsperiode gesäten Pflanzen an. In allen untersuchten Pflanzenteilen waren Senecionin N-Oxid und Seneciophyllin N-Oxid die dominierenden PA (nicht dargestellt). Der Anstieg der gesamten PA-Gehalte in Blättern und Stängeln geht vorwiegend auf die steigenden Gehalte an Seneciophyllin-N-Oxid zurück.



**Abb. 1** Keimlinge und ungekeimte, intakte Samen von *Senecio vulgaris* im Keimtest in Petrischalen, in % der ausgelegten Samen, bei Licht (Li) oder Dunkelheit (Du) und bei zwei Umgebungstemperaturen nach unterschiedlichen Vorbehandlungen des Saatguts (K: Kontrolle, T: Trockenstress, F: Frost); Differenz zu 100: verdorbene Samen; Fehlerbalken: Standardabweichung.

**Fig. 1** Seedlings and ungerminated, intact seeds of *Senecio vulgaris* (in % of initial number of seeds) from a germination test in Petri dishes performed in light (Li) or darkness (Du) at two temperatures. Pre-treatments of seeds K: control, T: drought stress, F: frost. Difference to 100: rotten seeds; error bar: standard deviation.



**Abb. 2** Pyrrolizidinalkaloid-Gehalte ( $\Sigma$  Retrorsin, Senecionin, Seneciphyllin, Senecivernin sowie deren korrespondierende N-Oxide) in der Lufttrockenmasse (LTM) von Blüte, Blatt und Stängel von *Senecio vulgaris* aus vier Saatterminen, Versuchsstation Kleinhohenheim. Werte mit gleichem Buchstaben nicht signifikant verschieden,  $P \leq 0,05$ . Vergleich der Saattermine für jeden Pflanzenteil (Buchstaben über Säulen) bzw. der Pflanzenteile über alle Termine (Buchstabenkennzeichnung in der Legende).

**Fig. 2** Content of pyrrolizidine alkaloids ( $\Sigma$  of retrorsine, senecionine, seneciphylline, senecivernine and their corresponding N-oxides) in air dried (LTM) flowers, leaves and stems of *Senecio vulgaris* plants from four sowing dates, research station Kleinhohenheim. Values with the same letter are not significantly different at  $P \leq 0.05$ . Comparison of sowing dates for each plant part: columns; comparison of plant parts across all dates: legend.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Keimtests spiegeln den derzeitigen, uneindeutigen Kenntnisstand wider. Die aktuellen Ergebnisse legen daher unter Einbeziehung international breit gefächerter Studien (HILTON, 1983; REN und ABBOT, 1991; FIGUEROA et al., 2007; LUTMAN et al., 2008; SÖCHTING und ZWARGER, 2014) den Schluss nahe, dass innerhalb der Spezies *S. vulgaris* verschiedene Ökotypen existieren, die sich zumindest hinsichtlich der Keimung und der darauf basierenden Populationsdynamik unterscheiden. Diese Ökotypen könnten auch aus Hybridisierungen mit anderen *Senecio*-Arten resultieren, die von VON BORSTEL et al. (1989) beschrieben wurden. *S. vulgaris* keimte im Licht und im Dunkeln; ein tiefes Vergraben von Samen durch Bodenbearbeitung könnte daher durch fatale Keimung und bei unterstellter Kurzlebigkeit in der Samenbank (FIGUEROA et al., 2007) zu einer Reduktion des Samenpotenzials führen. Bei annualen Kulturpflanzenbeständen könnte dies durch eine Grundbodenbearbeitung von mehr als 10 cm Tiefe erreicht werden, bei perennierenden Kulturen z.B. bei Heil- und Gewürzpflanzen, insbesondere bei älteren Pflanzenbeständen, durch ein tiefes Hacken. Gegen Ende der Vegetationsperiode gebildete Samen von *S. vulgaris* sind zeitnah in Herbst und Winter kalten Temperaturen ausgesetzt; nach den vorliegenden Ergebnissen könnte dadurch ein hoher Anteil der Samen in die Bodensamenbank eingehen, bis zum nächsten Frühjahr überdauern und dann in den Kulturen auflaufen. Bei der verwandten Art *S. jacobea* wurde die Möglichkeit einer frostinduzierten Dormanz beschrieben (VAN DER MEIJDEN und VAN DER WAALS-KOOI, 1979), und möglicherweise liegt bei *S. vulgaris* eine ähnliche Physiologie der Keimung vor.

Veränderungen bzw. Steigerungen im PA-Gehalt von Blättern im Jahresverlauf wurden bereits von JOHNSON et al. (1985) für die USA für drei *Senecio*-Arten beschrieben, die zusätzlich deutlichen Jahreseffekten unterworfen waren. Zur Verringerung von PA-Gehalten im Erntegut könnte die Vermeidung später Schnitte von Arznei- und Gewürzpflanzen bzw. von Blattsalaten beitragen. Dadurch könnte auch vermieden werden, dass Pflanzen unmittelbar vor Winter aussamen und deren Samen unter der kalten Witterung günstige Überdauerungsbedingungen vorfinden. Ein anderer Ansatz wäre eine besonders sorgfältige Beikraut- und Nacherntekontrolle bei späten Sätzen, z.B. bei Pflücksalaten oder Rucola, die häufig im Herbst kultiviert werden. Bei perennierenden Kulturen mit sehr hoher Wertschöpfung aus dem Medizinalbereich, in denen die chemische Unkrautkontrolle ohnehin stark eingeschränkt ist, müsste an dieser Stelle unter Umständen auf Handarbeit zurückgegriffen werden, auch um Kontaminationen in den Folgejahren zu vermeiden. Da sich die höchsten PA-Gehalte in den Blüten befanden, sind Beimischungen mit diesem Material besonders zu vermeiden. Dies könnte eventuell über eine

differenzierte Schnitthöhe erreicht werden. Über die spezifische Toxizität der beiden dominierenden PA Seneciphyllin-N-Oxid und Senecionin-N-Oxid im Vergleich zu anderen PA sind derzeit keine abschließenden Einschätzungen bekannt.

### Danksagung

Diese Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Fa. Pharmaplant Arznei- und Gewürzpflanzen; wird danken außerdem Oliver Hübner, Julia Herzog und Ellen Kinzer für die großartige Unterstützung im Feld und bei der Planung der Versuche.

### Literatur

- BFR - BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2007: Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Greiskraut verunreinigt. Stellungnahme Nr. 028/2007 des BfR vom 10. Januar 2007.
- BFR - BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2013: Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees. Stellungnahme 018/2013 des BfR vom 5. Juli 2013.
- FIGUEROA, R., D. DOOHAN, J. CARDINA und K. HARRISON, 2007: Common groundsel (*Senecio vulgaris*) seed longevity and seedling emergence. *Weed Science* **55**, 187–192.
- HARTMANN, T. und M. ZIMMER, 1986: Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *J. Plant Physiol* **122**, 67–80.
- HILTON, J.R., 1983: The influence of light on the germination of *Senecio vulgaris*. *New Phytol.* **94** (1), 29-37.
- JOHNSON, A.E., R.J. MOLYNEUX und G.B. MERRILL, 1985: Chemistry of toxic range plants. Variation in pyrrolizidine alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia* and *Crotalaria* species. *J. Agric. Food Chem.* **33**(1), 50-55.
- LUTMAN, P.J.W., K.J. BERRY und S.E. FREEMANN, 2008: Seed production and subsequent seed germination of *Senecio vulgaris* (groundsel) grown alone or in autumn-sown crops. *Weed Research* **48**, 237-247.
- NOWAK, M., C. WITTKÉ, I. LEDERER, B. KLIER, M. KLEINWACHTER und D. SELMAR, 2016: Interspecific transfer of pyrrolizidine alkaloids: An unconsidered source of contaminations of phytopharmaceuticals and plant derived commodities. *Food Chem.* **213**, 163-168.
- PLESCHER, A., S. WAHL, A. HICKETHIER und H. BLUM, 2016: Erfassung der standortabhängigen und kulturpflanzen-spezifischen Beikrautflora in Arzneipflanzenbeständen unter besonderer Berücksichtigung Pyrrolizidinalkaloid-haltiger Unkräuter. Präsentationsbeitrag beim BLE-Workshop „Pyrrolizidinalkaloide“ – Aktueller Stand bei Ausgangsstoffen für pflanzlichen Arzneimittel und deren Zubereitungen sowie Maßnahmen zur Belastungsreduzierung in der Landwirtschaft. Bonn, 13. April 2016.
- REN, Z. und R.J. ABBOT, 1991: Seed dormancy in Mediterranean *Senecio vulgaris* L. *New Phytol.* **117**, 673-678.
- SÖCHTING, H.-P. und P. ZWERGER, 2014: Dynamik der Verunkrautung mit *Senecio vulgaris* nach einem einmaligen Sameneintrag. *Julius Kühn-Archiv* **443**, 172-179.
- VAN DER MEUDEN, E. und R.E. VAN DER WAALS-KOOI, 1979: The population ecology of *Senecio jacobaea* in a sand dune system. *J. Ecol.* **67**, 131-153.
- VON BORSTEL, K., L. WITTE und T. HARTMANN, 1989: Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry* **28**(6), 1635-1638.
- WEBER, E.A., K. FRICK, S. GRUBER und W. CLAUPEIN, 2010: Research and development towards a laboratory method for testing the genotypic predisposition of oil seed rape to secondary dormancy. *Seed Sci. Technol.* **38**, 298-310.
- WIEDENFELD, H. und J. EDGAR, 2011: Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem Rev.* **10**, 137–151.