

**Hochschule Osnabrück**  
University of Applied Sciences

## **FHprofUnt - Forschungsvorhaben**

**Entwicklung und Optimierung der Biofumigation  
zur nichtchemischen Bekämpfung von *Verticillium dahliae***

### **Abschlussbericht**



**Prof. Dr. Christian Neubauer**  
**Dipl. Ing. Benedikt Heitmann**

---

Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Förderlinie "Forschung an Fachhochschulen mit Unternehmen" (FHprofUnt) unter dem Förderkennzeichen 17105X10 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

## Projektdurchführung:

Prof. Dr. Christian Neubauer, Dipl. Ing. Benedikt Heitmann

Hochschule Osnabrück, Fakultät für Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur

Oldenburger Landstraße 24, 49090 Osnabrück

## Projektzeitraum:

1.9.2010 - 31.8.2013

## Kooperationspartner:



- Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Chemische Ökologie, Prof. Dr. Caroline Müller, Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld
- P. H. Petersen Saat-zucht Lundsgaard GmbH & Co. KG, Dipl. Ing. Michaela Schlathöler Streichmühler Str. 8a, 24977 Grundhof
- Landwirtschaftskammer Niedersachsen, Kompetenzzentrum für Obstbau - OVB Jork Versuchs und Beratungsstation für Obst und Gemüse (VBOG), Dr. Rudolf Faby Spredaer Str. 2, 49377 Vechta-Langförden
- Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum - Rheinpfalz-, Lehr- und Versuchsbetrieb Queckbrun-nerhof, Dr. Norbert Laun, 67105 Schifferstadt



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Laborversuche</b>	<b>12</b>
2.1.1 Herstellung des Mikrosklerotien-Quarzsandes	12
2.1.2 Bestimmung der Toxizität von Isothiocyanaten in sterilem Sand	15
2.1.3 Ermittlung der Toxizität von 2-propenyl-ITC in natürlichen Böden	16
2.1.4 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Brassicaceae	18
2.1.4.1 Herkunft und Produktion der Grünmassen	18
2.1.4.2 Herkunft und Produktion der Samenmehle	22
2.1.4.3 Analyse der Glucosinolat-Gehalte der Biomassen	24
2.1.4.4 Ermittlung der Freisetzung von Isothiocyanaten	24
2.1.4.5 Evaluierung der Wirkung der Biomassen mittels Biotest im Quarzsand	27
2.1.4.6 Einfluss der Biomassen auf die Wirkung freigesetzter Isothiocyanate	29
2.1.4.7 Evaluierung der Wirkung von Biomassen mittels Biotest in Böden	31
2.1.4.8 Nicht GSL-abhängige Wirkung von Samenmehlen	32
<b>2.2 Praxisversuche</b>	<b>33</b>
2.2.1 Standort Schifferstadt	33
2.2.2 Standort Langförden	36
2.2.3 Standort Osnabrück	38
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Toxizität von Isothiocyanaten in sterilem Sand</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Toxizität von 2-propenyl-ITC in natürlichen Böden</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Grünmassen im Labor</b>	<b>45</b>

---

3.3.1 Glucosinolat-Profile der Grünmassen	45
3.3.2 Theoretisches Biofumigationspotential der Grünmassen	49
3.3.3 Wirkung der Grünmassen im Biotest in Quarzsand	51
3.3.4 Einfluss der Grünmassen auf die Wirkung freigesetzter Isothiocyanate	54
3.3.5 Wirkung der Grünmasse von <i>B. juncea</i> in natürlichen Böden	54
<b>3.4 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Samenmehlen im Labor</b>	<b>56</b>
3.4.1 Glucosinolat-Profile der Samenmehle	56
3.4.2 Freisetzungsrates von 2-propenyl-ITC bei Sinigrin-haltigen Samenmehlen	59
3.4.3 Wirkung der Samenmehle im Biotest in Quarzsand	60
3.4.4 Wirkung des Samenmehls von <i>B. juncea</i> in natürlichen Böden	63
3.4.5 ITC-Freisetzung des Samenmehls von <i>B. juncea</i> in natürlichen Böden	65
3.4.6 Wirkung des Samenmehls von <i>B. juncea</i> in geschlossenen u. offenen Gefäßen	66
3.4.7 Einfluss des Samenmehls auf die Wirkung von freigesetztem 2-propenyl-ITC	66
3.4.8 Nicht-GSL-abhängige Wirkung des Samenmehls von <i>B. juncea</i>	67
<b>3.5 Praxisversuche</b>	<b>68</b>
<b>4. Diskussion und Schlussfolgerungen</b>	<b>71</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>

## 1. Einleitung

Bodenbürtige Schaderreger stellen in der intensiven Pflanzenproduktion einen wichtigen begrenzenden Faktor dar. Aufgrund ihrer meist ausgeprägten Fähigkeiten zu überdauern und sich an anfälligen Wirtspflanzen rasch vermehren zu können, führen einseitige Fruchtfolgen zu einer Anreicherung der Pathogene im Boden. Neben den direkten Schäden, die sie in der laufenden Vegetationsperiode verursachen können, stellen verseuchte Flächen, die über viele Jahre für den Anbau bestimmter Kulturen nicht mehr nutzbar sind, einen erheblichen indirekten Schaden für die Produktion dar. Ihre zunehmende Bedeutung resultiert schließlich auch aus der Tatsache, dass der Praxis direkte wirksame Bekämpfungsstrategien, insbesondere chemische Bodenentseuchungsverfahren, zukünftig nicht mehr zur Verfügung stehen.

In der gartenbaulichen Produktion gilt der Erreger der *Verticillium*-Welke als einer der wichtigsten bodenbürtigen pilzlichen Schaderreger. Große Schäden werden vor allem im Erdbeeranbau, in der Produktion von Alleebäumen sowie in Teilen des Gemüsebaus verzeichnet. Darüber hinaus führt insbesondere der Anbau von Kartoffeln zu einer Verschleppung und Anreicherung des Erregers in unseren Böden. *Verticillium* bildet im abgestorbenen Wirtsgewebe Mikrosklerotien aus, mit denen er lange Zeiträume im Boden überdauern kann und die auf belasteten Flächen als Ausgangsinokulum für Neuinfektionen anzusehen sind. Der Erreger vermehrt sich nicht nur an seinen zahlreichen Wirtspflanzen intensiv, auch die Wurzeln von Nicht-Wirtspflanzen vermag er zu besiedeln, um neue Mikrosklerotien zu bilden (Mol et al. 1996). Das Ziel einer Entseuchungsmaßnahme muss deshalb eine möglichst umfassende und nachhaltige Verminderung einer Mikrosklerotien-Population sein, um eine Fläche wieder dauerhaft nutzen zu können.

Im Gegensatz zu anderen bodenbürtigen Pilzen steht für *Verticillium* ein quantitatives Bodennachweisverfahren zur Verfügung mit dem der Mikrosklerotien-Belastungsgrad einer Fläche erfasst werden kann (Neubauer und Heitmann 2011). Das Verfahren wird in der Praxis als Grundlage einer gezielten Flächenauswahl eingesetzt. Gleichzeitig bietet es die Möglichkeit, die Wirksamkeit von Bekämpfungsstrategien oder den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Erreger bzw. sein Inokulumpotential im Boden quantitativ zu erfassen. Für das geplante Ziel des Forschungsvorhabens - die Evaluierung des Potentials verschiedener Biofumigationsstrategien - kann deshalb der Erreger als besonders geeignet angesehen werden.

In vielen Anbausystemen weltweit gilt der Einsatz synthetischer Bodenentseuchungsmittel gegen bodenbürtige Schaderreger - insbesondere auch *Verticillium* - als unverzichtbar. Im Montreal-Protokoll wurde aufgrund der klimaschädlichen Auswirkungen ein weltweiter Ausstieg aus der Anwendung von Methylbromid - wichtigster Wirkstoff in diesem Zusammenhang - bis 2005 vereinbart. Auch die Anwendung anderer Wirkstoffe wird wegen ihrer ungünstigen Umwelteigenschaften mehr und mehr ein-

geschränkt. Vor diesem Hintergrund werden dringend umweltfreundliche und wirksame Alternativen benötigt, die sich ökonomisch sinnvoll in die verschiedenen Anbausysteme integrieren lassen. Insbesondere die Biofumigation gilt hierbei als ein aussichtsreiches Verfahren (Askew 2004; Lopez-Medina et al. 2004).

Es basiert auf dem Grundprinzip, dass Pflanzen Inhaltsstoffe produzieren, die direkt oder indirekt ihre biologische Umwelt beeinflussen können. Die gezielte Nutzung solcher, auch als allelopathischer Substanzen bezeichneten Verbindungen, eröffnet somit neue Möglichkeiten im integrierten Pflanzenschutz. In diesem Zusammenhang werden Senfölglycoside, sog. **Glucosinolate** (im Folgenden abgekürzt: **GSL**), die im Gewebe von Pflanzenarten aus der Ordnung Capparales, insbesondere der Familie Brassicaceae, gebildet werden, als besonders aussichtsreich eingestuft (Brown und Morra 1997). Über 100 verschiedene GSL werden auf der Grundlage der unterschiedlichen chemischen Struktur einer vorhandenen Seitenkette unterschieden. Bei Zerstörung des Zellverbandes bzw. der Zellen werden GSL freigesetzt und durch enzymatische Hydrolyse unter Einwirkung des pflanzeigenen Enzyms Myrosinase zu **Isothiocyanaten** (im Folgenden abgekürzt: **ITC**), Nitrilen, Thiocyanaten und anderen Verbindungen abgebaut. GSL und Myrosinase sind im intakten Gewebe auf unterschiedliche Zellbereiche kompartimentiert. Erst durch Zerstörung der Zellen gelangen sie zueinander, so dass unter Anwesenheit von Wasser der schnelle enzymatische Abbau der GSL einsetzt. Die mehr oder weniger flüchtigen Abbauprodukte weisen, im Gegensatz zu ihren GSL-Ausgangssubstanzen, bioaktive Eigenschaften auf und können toxisch auf Organismen, wie z. B. Insekten, Bakterien und Pilze wirken. Dies trifft insbesondere auf die unter den Abbauprodukten dominierenden ITC zu, die in ihrer chemischen Struktur der Verbindung Methylisothiocyanat, Wirksubstanz der synthetischen Bodenentseuchungsmittel Metam-Natrium oder Basamid Granulat, ähneln. Ihre bioaktiven Eigenschaften resultieren aus einer unspezifischen und irreversiblen Reaktion mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen und Aminosäuren (Brown und Morra 1997).

Der Begriff Biofumigation wurde ursprünglich geprägt, um die suppressiven Wirkungen GSL-haltiger Pflanzen, vor allem verschiedener Brassicaceae, gegenüber Schädlingen und Krankheitserregern zu beschreiben, die auf eine Freisetzung bioaktiver GSL-Hydrolyse-Produkte, insbesondere ITC, aus in den Boden eingearbeiteter Biomasse im Rahmen einer Gründüngung beruhen (Kirkegaard und Matthiesen 2004). Zusätzlich können Wirkungseffekte auch auf freigesetzte toxische Substanzen zurückgeführt werden, die nicht aus GSL entstehen (Nicht-GSL-Effekt). Dieser Begriffsdefinition folgend hat sich das Forschungsvorhaben im Kern gezielt mit der Evaluierung bzw. Maximierung einer ITC-bezogenen GSL-Wirkung von Biomassen befasst.

Nicht unerwähnt darf bleiben, dass in der Literatur bisweilen der Begriff Biofumigation in Zusammenhang mit den allgemeinen positiven Effekten der Gründüngung und ihrer direkten oder indirekten Wirkung auf bodenbürtige Schadorganismen eine erweiterte Begriffsdefinition erfahren hat. So vermag schon eine Veränderung der Bodenstruktur oder die Erhöhung der mikrobiellen Aktivität aufgrund der

Zufuhr organischer Substanz einen suppressiven Effekt auf Pathogene auszuüben. Eine Reduzierung von Schadorganismen kann schließlich auch auf Nichtwirtspflanzen- und Fangpflanzeneffekte beruhen. Diese Effekte waren aber nicht Gegenstand der Untersuchungen des Vorhabens.

Das klassische Biofumigationsprinzip sieht die Zerkleinerung und Einarbeitung GSL-haltiger Triebe und Blätter (Grünmasse) von Pflanzen vor. Studien zeigen, dass die GSL-Konzentration im Stängel- und Blattgewebe mit voranschreitender Pflanzenentwicklung bis zur Blüte hin abnimmt, während aber parallel die GSL-Menge pro Fläche aufgrund der zunehmenden Biomasse-Produktion ansteigt (Sarwar und Kirkegaard 1998; Belostas et al. 2004). Vor diesem Hintergrund wird bei der Biofumigation das Einarbeiten der Biomasse zum Zeitpunkt der Blüte empfohlen. Zwar kann für viele *Brassica*-Genotypen die höchste flächenbezogene GSL-Menge aufgrund des sehr hohen GSL-Gehaltes der Samen zur Samenreife ermittelt werden, jedoch ist dies aus anbautechnischer Sicht ein zu später Zeitpunkt für eine Einarbeitung. Eine Zerstörung der Samenkörner ist beim Mulchvorgang nur schwer zu erzielen, während gleichzeitig eine unerwünschte Samenverseuchung des Bodens droht (Belostas et al. 2004). Gleichwohl eröffnet der im Vergleich zur grünen Biomasse um ein vielfaches höhere GSL-Gehalt der Samen die Perspektive einer alternativen Anwendung der Biofumigation. Als Samenmehl wird der zerkleinerte Schrot bezeichnet, der nach der Entfernung des Ölanteils durch Kaltpressung zurückbleibt. Das Verfahren bietet gegenüber der Gründüngung Anwendungsvorteile. So lässt sich Samenmehl als biologisches Entseuchungsmittel für eine gewisse Zeit lagern und gezielt auf bestimmten Flächen ausbringen. Durch Erhöhung der Aufwandmenge bei gleichzeitig homogenerer Verteilung des Mehls im Boden lassen sich im Vergleich zur Einarbeitung grüner Biomasse Wirkungssteigerungen erzielen (Curto et al. 2004; Lazzeri et al. 2004; Brown und Morra 2005.).

In verschiedenen praxisnahen Studien konnte eine signifikante Wirkung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch Nutzung der grünen Biomasse gegenüber unterschiedlichen bodenbürtigen Pilzen festgestellt werden. (Lazzeri et al. 2000, 2004; Daugovish et al. 2004; Collins et al. 2006). Allerdings spiegeln die Versuchsergebnisse zum Teil ein sehr uneinheitliches und widersprüchliches Bild wider, das sich kaum zielgerichtet interpretieren lässt. Dies hängt mit dem meist empirischen Ansatz der Forschungs- und Versuchstätigkeit zusammen. In Kombination mit den geringen Kenntnissen zur Wirkungsweise des Systems und seiner Einflussfaktoren liefert er nur einen sehr eingeschränkten Erkenntnisrahmen, um daraus Ansätze einer gezielten Optimierung der Biofumigation ableiten zu können (Kirkegaard und Matthiesen 2004; Morra 2004). So verweisen die Autoren zu Recht auf das Problem, bei Freilandversuchen die ITC-abhängige Biofumigationswirkung zu interpretieren, da keine Informationen über die im Pflanzengewebe gebildeten Arten von GSL und ihrer Konzentration vorliegen. Zusätzlich fehlen geeignete Kontrollen, wie z. B. *Brassica*-Arten mit unterschiedlichen GSL-Gehalten oder Pflanzenarten ohne GSL-Gehalt, um die GSL-abhängigen Effekte von anderen Gründüngungseffekten abgrenzen zu können. Schließlich ist es zwingend notwendig, dass die nach Einarbeitung der Biomasse im Boden ablaufenden chemischen und physikalischen

Prozesse bezüglich der GSL-Hydrolyse-Produkte besser verstanden werden. Vor diesem Hintergrund fordern Kirkegaard und Matthiesen (2004) einen systematischen Ansatz in der Forschung zu verfolgen, mit dem Ziel, das Potential der Biofumigation zu ermitteln und weiterzuentwickeln (siehe Abb. 1). Dieser Ansatz bildete die Grundlage für die Durchführung des vorliegenden Vorhabens.

Ein theoretisches Biofumigationspotential der eingearbeiteten Biomasse ergibt sich zunächst aus ihrem GSL-Profil, d. h. der Art und Konzentration der vorhandenen GSL. Deshalb ist für dessen Bestimmung ein quantitativer und qualitativer Nachweis der GSL im Gewebe nach Extraktion und Desulfurierung mittels HPLC zwingend notwendig. Die maximal freisetzbare ITC-Menge wird darüber hinaus von der Biomasse bestimmt, d. h. der Menge der eingearbeiteten Grünmasse oder des ausgebrachten Samenmehls. Schließlich hängt die potentielle Wirkung von der Toxizität der spezifischen GSL-Abbauprodukte, insbesondere der relevanten ITC, gegenüber dem Zielorganismus ab. Vor diesem Hintergrund war im Rahmen des Vorhabens ein adäquater Test zu entwickeln und durchzuführen, um die Toxizität verschiedener ITC gegenüber den Mikrosklerotien von *Verticillium* vergleichend zu bestimmen.

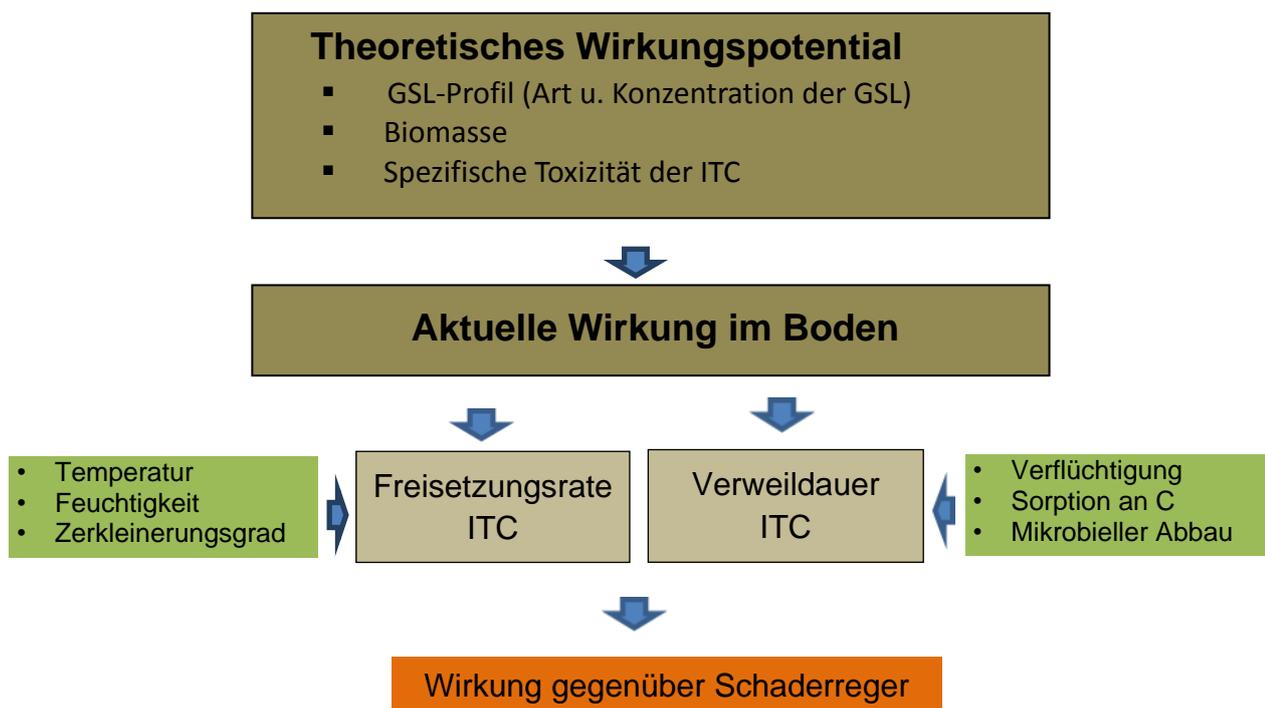


Abb. 1: Systematischer Ansatz zur Evaluierung und Entwicklung der Biofumigation als Grundlage des Forschungsvorhabens (verändert nach Morra und Krikegaard 2002)

Die zu erwartende aktuelle Wirkung der eingearbeiteten Biomasse im Boden muss im Vergleich als deutlich geringer angesehen werden. Zwar kann zunächst auf der Grundlage der GSL-Konzentration

und der Biomasse die potentielle, d. h. maximale Freisetzungsmenge an ITC errechnet werden. Verschiedenen Studien zeigen aber, dass nicht alle GSL umgewandelt werden und die aktuelle ITC-Freisetzungsrates zwischen 1,0 und 56,0 % schwanken kann (Morra und Kirkegaard 2002; Gimsing und Kirkegaard 2006; Gimsing und Kirkegaard 2009). Umweltfaktoren, wie Temperatur und Feuchtigkeit, die Myrosinase-Aktivität und insbesondere der Zerkleinerungsgrad des Gewebes beeinflussen die ITC-Freisetzung und müssen bei der Beurteilung des realen Biofumigationspotentials berücksichtigt werden.

Da die Wirkung der GSL-Hydrolyse-Produkte auch von deren Verweildauer im Boden abhängt, beeinflussen weitere Bodenfaktoren die aktuelle Biofumigationwirkung einer eingearbeiteten Biomasse. Die Sorption von ITC an organische Kohlenstoffverbindungen und deren Inaktivierung sowie ihr mikrobieller Abbau sind weitere wichtige Mechanismen, die ihre Wirkung mindern können (Borek et al. 1995; Warton et al. 2003; Rumberger und Marschner 2004; Gimsing und Kirkegaard 2009). Darüber hinaus existieren die Substanzen in Abhängigkeit der Bodeneigenschaften unterschiedlich lang in fester, flüssiger oder gasförmiger Phase (Morra 2004), was Einfluss auf ihre Verweildauer hat. Bio-tests, die ohne Boden durchgeführt werden, können deshalb u. U. nicht exakt die biologische Aktivität oder Toxizität einer ITC wiedergeben.

Gesamtziel des Vorhabens war es, einem systematischen umfassenden Ansatz folgend, das theoretische Biofumigationspotential (potentielle Wirkung) sowie das unter praktischen Bedingungen zu erwartende reale Wirkungspotential (aktuelle Wirkung) verschiedener Genotypen aus der Familie der Brassicaceae hinsichtlich ihrer gebildeten Grünmassen als auch der gewonnenen Samenmehle gegenüber dem Erreger *Verticillium* zu evaluieren. Die Ergebnisse sollten sowohl die Grundlage für eine zielgerichtete Implementierung der Biofumigation in praktische Anbausysteme liefern als auch die Basis für eine Optimierung und zukünftige Weiterentwicklung des Verfahrens bilden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Laborversuche

#### 2.1.1 Herstellung des Mikrosklerotien-Quarzsandes

Zur Durchführung der verschiedenen Labor-Biotests wurde ein standardisiertes, auf Quarzsand basierendes und mit Mikrosklerotien (MS) von *V. dahliae* künstlich verseuchtes Medium (MS-Quarzsand) entwickelt und eingesetzt. Seine Herstellung setze sich aus folgenden Schritten zusammen:

##### Produktion der Mikrosklerotien

Hierzu wurden Kartoffelpflanzen im Gewächshaus angezogen. Zum Zeitpunkt der Blüte wurden Kartoffelstängel geerntet, in 10 cm lange Stücke geschnitten und entlaubt. Anschließend wurden die Stängel bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Nachfolgend wurden die Kartoffelstängel in der Reinraumwerkbank im Tauchverfahren (30 Sek.) mittels einer Sporensuspension (*V. dahliae*-Isolat E39/05, Sammlung Hochschule Osnabrück) von  $10^6$  Sporen/ml im Tauchverfahren inokuliert.

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte zuvor in einem Czapeck-Dox-Flüssigmedium (CDA), das sich wie folgt zusammensetzt:

30,0 g	Saccharose (Fa. Merck)
3,0 g	NaNO <sub>3</sub>
1,0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 g	KCl
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
0,01 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
1000 ml	Aqua dest.

Vor dem Autoklavieren (121 °C, 20 Min.) wurde der pH-Wert des Flüssignährmediums auf 5,0 eingestellt. In Erlenmeyerkolben (250 ml) wurden jeweils 50 ml des autoklavierten Flüssignährmedium mit fünf Myzelstücken (Ø 0,5 mm) des *Verticillium*-Isolates beimpft und für fünf Tage bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler bei ca. 80 U/Min. inkubiert. Anschließend wurde mittels Thomakammer die Sporendichte der Flüssigkultur bestimmt und durch Verdünnung mit sterilem Leitungswasser eine Suspension mit einer Dichte von  $10^6$  Konidien/ml hergestellt.

Die inokulierten Kartoffelstängel wurden in Neubauerschalen (Ø 20 cm) auf Filterpapier bei 20 °C und Dunkelheit im Klimaschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit von 2 Wochen bildeten sich auf der Stängeloberfläche die Mikrosklerotien. Die schwarz verfärbten Kartoffelstängel wurden entnom-

men, auf Filterpapier in der Reinraumwerkbank bei 18-20°C für ca. 48 Stunden getrocknet und anschließend in einer elektrischen Kaffeemühle zu einem feinen Pulver vermahlen, das nachfolgend über ein Analysensieb (0,5 mm) homogenisiert wurde. Die Lagerung des Mikrosklerotien-Pulver erfolgte im Glasbehälter bei 6 °C im Kühlschrank.

#### Herstellung des Quarzmehl-Inokulums

Zehn Gramm des Mikrosklerotien-Pulvers wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit sterilem Leitungswasser zu einer Suspension von 100 ml aufgefüllt. Diese wurde für 30 Minuten bei 200 U/Min. auf einem Horizontalschüttler bewegt, um zusammenhängende Mikrosklerotien zu vereinzeln. Im Anschluss erfolgte eine Nasssiebung der Mikrosklerotien-Suspension mit einer Vibrations-siebmaschine (Analysette 3, Fa. Fritsch) über drei Siebgrößen (1 mm, 125 µm, 20 µm) mit dem Ziel, ein homogenes Inokulum herzustellen, das sich aus Mikrosklerotien der Größenfraktion 20-125 µm zusammensetzt. Die Dauer des Siebvorganges, unter kontinuierlicher Wasserzufuhr, betrug 5 Minuten mit einem Siebintervall von 10 Sekunden und einer Schwingungsamplitude von 3 mm. Nach dem Siebvorgang wurde das auf dem 20 µm-Sieb liegende Siebgut mit Hilfe einer Spritzflasche und sterilem Leitungswasser in einen sterilen Papierfilter (Ø 90 mm) überführt. Im Anschluss wurde das Filtrat in einer Reinraumwerkbank bei 18-20 °C für 24 h getrocknet.

Nach der Trocknung ist das Material in einem Mörser zerkleinert und zu einem feinen Pulver vermahlen worden. Das Inokulum-Pulver wurde anschließend in 500 Gramm sterilisiertem Quarzmehl (Microsil® M6, Fa. Euroquarz) der Körnung 0,001-0,25 mm gleichmäßig eingemischt. Die Lagerung erfolgte in einer 500 ml Glasflasche (Fa. Duran) bei 6 °C im Kühlschrank.

#### Bestimmung der Mikrosklerotien-Dichte

Zur Bestimmung der Mikrosklerotien-Dichte wurde in fünffacher Wiederholung jeweils 1 Gramm des Quarzmehl-Inokulums im Erlenmeyerkolben (250 ml) mit 100 ml sterilem Leitungswasser aufgefüllt. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 200 U/Min. auf dem Horizontalschüttler bewegt und im Anschluss für 2 Minuten mit der Vibrations-siebmaschine Analysette 3 (Fa. Fritsch) über drei Siebgrößen (1 mm, 125 µm, 20 µm) gesiebt. Nach Beendigung des Siebvorganges wurde das auf dem 20 µm-Sieb liegende Siebgut mit Aqua dest. über einen Glastrichter wiederum in einen Erlenmeyerkolben (250 ml) überführt und anschließend mit sterilem Leitungswasser auf 100 ml aufgefüllt. Mehrere Verdünnungsstufen der Suspension (1:10 - 1:1000) wurden auf einen Selektivnährboden (Pektatmedium - PEM) nach Neubauer und Heitmann (2011) ausgebracht. Die Platten wurden für 14 Tage bei 20 °C und Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss konnten unter einer Stereolupe die typischen *Verticillium dahliae*-Kolonien gezählt und die Mikrosklerotien-Dichte im Quarzmehl-Inokulum bestimmt werden.

Bei der Auswertung wurde erkennbar, dass nicht alle Mikrosklerotien auf dem Selektivnährmedium ausgekeimt waren. Um den Anteil nicht keimfähiger Mikrosklerotien im Quarzmehl-Inokulum zu bestimmen, wurde die Gesamtzahl der Mikrosklerotien optisch erfasst. Hierzu wurden in dreifacher Wiederholung jeweils 0,1785 g Quarzmehl-Inokulum in einem Erlenmeyerkolben (250 ml) mit 100 ml sterilem Leitungswasser suspendiert. Eine Menge von 0,1785 g Quarzmehl-Inokulum entsprechen 50,0 g Einwaage MS-Quarzsand bei einem eingestellten Zielwert von 200,0 colony forming units (cfu)/g Tests substrat. Nach Homogenisierung für 30 Minuten bei 200 U/Min. auf einem Horizontalschüttler wurden die Suspensionen auf einem Magnetrührer kontinuierlich in Bewegung gehalten. Mittels einer Pipette erfolgte aus der Mitte des halben Radius des Erlenmeyerkolbens die Entnahme eines 500 µl-Aliquotes, das unter Unterdruck über eine Büchner-Filter (Ø 9 cm) auf ein Filterpapier (Ø 90 mm, Fa. Macherey-Nagel) übertragen wurde, in zehnfacher Wiederholung. Unter der Stereolupe wurde die Gesamtanzahl Mikrosklerotien optisch gezählt. In Bezug auf die Kolonien-Anzahl auf dem Selektivnährmedium konnte die Keimrate der Mikrosklerotien im Quarzmehl-Inokulum bestimmt werden (Tab.1).

#### Mikrosklerotien-Dichten der verwendeten Inocula

Tab. 1: Dichten von Mikrosklerotien (MS) verwendeter Chargen des Quarzmehl-Inokulums

Charge	Gekeimte MS	Gesamtanzahl MS	
	Auswertung Nährboden (MS/g Quarzmehl) <sup>1</sup>	Optische Auswertung	Keimrate MS in %
1	14.005 (771)	123.100 (4.387)	11,4
2	56.160 (3.416)	123.700 ( )	45,4
3	83.450 ( )	181.700 ( )	45,9

<sup>1</sup> Mittelwerte mit Standardabweichungen in Klammer

#### Herstellung des MS-Quarzsandes

Quarzsand (Körnung 0,063-0,2 mm, Fa. Nielson) wurde autoklaviert (121 °C, 60 Min.) und bei 150 °C für 6 Stunden im Sterilschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde in einer Reinraumwerkbank die für eine Versuchsserie benötigte Menge des sterilisierten Quarzsandes in einen verschließbaren Eimer (10,0 l) eingewogen und die entsprechende Menge Quarzmehl-Inokulum zur Erreichung eines Zielwert von 100,0 oder 200,0 cfu/g Quarzsand zugegeben. Anschließend erfolgte eine gleichmäßige Durchmischung der Komponenten zu einer homogenen Mischung.

In allen Biotests wurde eine Feuchtigkeit, die 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität ( $WK_{max}$ ) des Quarzsandes entsprach, eingestellt. Die Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des verwendeten Quarzsandes erfolgte durch die vereinfachte Trichtermethode nach SOP 6.1.1 (Hochschule Osnabrück 2008).

## 2.1.2 Bestimmung der Toxizität von Isothiocyanaten im Sand

Mittels eines standardisierten Biotestes wurde *in vitro* die Toxizität von fünf relevanten, kommerziell verfügbaren Isothiocyanaten gegenüber Mikroklerotien vergleichend untersucht (Tab. 2).



Abb. 2

Tab. 2: Isothiocyanate, deren Toxizität *in vitro* bestimmt wurde

Glucosinolat (Trivialname)	Isothiocyanat	Molekülmasse der Seitenkette (g/mol)	Hersteller
<i>Alipathische-GSL</i>			
Glucoapparin	Methyl-ITC	73,12	Merck
Sinigrin	2-Propeny-ITC	99,15	Merck
Glucoraphenin	4-Methylsulfinyl-3-butenyl-ITC	175,27	Phytolab
<i>Aromatische-GSL</i>			
Glucotropaeolin	Benzyl-ITC	149,21	Sigma-Aldrich
Gluconasturtiin	2-Phenylethyl-ITC	163,24	Sigma-Aldrich

Die Versuche wurden in gasdichten Glasflaschen (50,0 ml, Fa. Schott) durchgeführt (Abb. 2), die jeweils mit 75,0 g MS-Quarzsand (200 MS/g Sand) befüllt wurden. Alle ITC wurden mit fünf Konzentrationen (1, 5, 25, 125, 625 nmol/g Sand) in jeweils vierfacher Wiederholung getestet. Die Konzentrationen waren auf der Grundlage von Vorversuchen ermittelt worden und deckten eine große Bandbreite fungizider Wirkungen ab. Zunächst wurden Stammlösungen hergestellt. Hierzu wurden die ITC in Methanol gelöst und mit sterilisiertem Leitungswasser zu einer Gesamtmenge von 10,35 ml aufgefüllt.

Die Zugabe dieser Menge in eine Flasche entsprach 60 % Wasserkapazität von  $WK_{\max}$  des verwendeten Quarzsandes. Ausgehend von der Stammlösung wurden Verdünnungsstufen hergestellt.

In Vorversuchen war zuvor festgestellt worden, dass Methanol in der höchsten applizierten Menge keinen letalen Effekt auf die Mikrosklerotien ausübt. Nach Überführung der jeweils 10,35 ml ITC-Lösung in eine Glasflasche wurde ihr Deckel fest verschlossen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung im Quarzsand zu gewährleisten, wurde das Gefäß mehrfach auf einer Tischplatte aufgesetzt, bis die Lösung den Sand vollständig durchdrungen hatte. Kontrollen erhielten ausschließlich Wasser. Die Flaschen wurden anschließend für 48 Stunden bei 20 °C und Dunkelheit inkubiert. Nachfolgend wurde die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien nach der Methode von Neubauer und Heitmann (2011) bestimmt. Abweichend wurde jeweils die komplette Sandmenge pro Glasgefäß von 75,0 g nach der Trocknung gesiebt bzw. analysiert.

In Beziehung zur Kontrolle wurden der Anteil gekeimter Mikrosklerotien bzw. die Wirkungsgrade der einzelnen ITC-Konzentrationen errechnet. Anschließend wurden  $LD_{50}$ - und  $LD_{90}$ -Werte als toxikologische Vergleichsparameter mittels einer Probit-Analyse unter Nutzung des Statistikpaketes SPSS ermittelt.

### **2.1.3 Ermittlung der Toxizität von 2-propenyl-ITC in natürlichen Böden**

In einer ergänzenden Versuchsreihe wurde die Toxizität von 2-propenyl-ITC in 22 verschiedenen, natürlich mit *V. dahliae* belasteten Böden untersucht. Die Böden stammen aus Einsendungen von Bodenproben der Praxis bzw. der Sammlung der Hochschule Osnabrück. Im Vorfeld wurden Bodenart mittels Fingerprobe sowie  $C_{\text{org}}$ -Gehalt und pH-Wert nach den Methoden der AG Boden (2005) ermittelt (Tab. 3). Zusätzlich wurde der im Biotest verwendete MS-Quarzsand in die Untersuchung als Vergleichsstandard mit einbezogen.

Es wurde die gleiche Versuchsanordnung wie unter 2.1.2 beschrieben durchgeführt. Abweichend wurden 50,0 g Boden in die Glasflaschen gefüllt. Die Toxizität von 2-propenyl-ITC wurde einheitlich mit einer Dosis von 150,0 nmol/g Boden geprüft. In einem ersten Schritt wurde eine entsprechende Stammlösung in Wasser hergestellt. Die für die anzustrebende Konzentration notwendige Menge Stammlösung wurde je nach Bodenart zusätzlich mit 18,4 bis 22,7 Gewichtsprozent sterilem Leitungswasser versetzt und anschließend vollständig in die Glasflasche überführt. Damit wurde in allen Bodenproben eine Feuchtigkeit von ca. 60 % der maximalen Wasserkapazität eingestellt. Kontrollen erhielten ausschließlich Wasser. Pro Bodenprobe wurden Kontrollen und 2-propenyl-Behandlungen in jeweils dreifacher Wiederholung angelegt. Weitere Durchführung und Auswertung sind 2.1.2 zu entnehmen. Für jede 2-propenyl-Behandlung einer Bodenprobe wurde in Bezug zur Kontrolle der Wirkungsgrad berechnet.

Tab. 3: Natürliche Mikrosklerotien-Belastung sowie Eigenschaften der verwendeten Bodenproben

Bodenprobe	Ausgangsverseuchung [MS/g Boden]	Bodenart	pH-Wert	C <sub>org</sub> -Gehalt
406-2	22,0	Uts	5,6	1,19
404-3	46,4	Su2	6,7	0,58
403-1	32,0	Su3	6,0	0,84
401-1	85,2	Lu	7,3	1,41
396-1	35,2	Su3	5,5	0,97
395-1	90,0	Lt3	7,2	1,04
393-4	24,0	Su3	7,1	1,28
386-2	24,0	Ls4	7,3	0,94
373-2	32,0	Su2	7,3	1,09
371-6	23,6	Ls4	7,4	1,89
365-1	43,6	Us	5,9	1,34
364-6	64,4	Su2	5,4	2,08
363-1	58,4	Tu4	6,7	1,09
360-2	83,6	Su2	5,2	1,34
357-2	20,4	Su2	7,2	0,86
354-3	44,4	Su2	6,1	1,78
351-1	26,8	Su2	5,8	1,42
348-1	18,8	Su2	5,7	0,90
346-12	36,0	Su2	6,2	1,53
417-23/24	36,0	Ut2	7,5	1,09
B4	38,0	Su3	5,8	0,87
418-2/3	132,2	Su4	5,9	1,73
MS-Quarzsand	100,0	Ss	7,2	0,0

## 2.1.4 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Brassicaceen

### 2.1.4.1 Herkunft und Produktion der Grünmassen

#### Feldanbau der Genotypen

Zur Produktion von Grünmassen und Samenmehlen für anschließende Laborversuche wurden in den Jahren 2010-2012 verschiedene Arten bzw. Sorten aus der Familie der Brassicaceae auf den Versuchsflächen (Wulves Kamp) der Hochschule Osnabrück angebaut (Tab. 4).

Vor der Aussaat wurde die Fläche mit einem Grubber bearbeitet und eingeebnet. Im Anschluss erfolgte die Entnahme einer Bodenprobe zur Düngerbedarfsermittlung. Hierbei wurden Sollwerte für N von 80 kg/ha und für S von 60 kg/ha sowie für P, K und Mg jeweils die Gehaltsklasse C angestrebt. Zur Anwendung kamen die Dünger Entec 26, Superphosphat und Patenkali, die gleichmäßig auf die Anbaufläche ausgestreut und anschließend mit einer Kreiselegge eingearbeitet wurden. Der pH-Wert des schluffigen Sandbodens betrug 5,9 und konnte als optimal angesehen werden.

Die Aussaat erfolgte im Jahr 2010 am 13. Juli, im Jahr 2011 am 07. Juni und 2012 am 14. Mai mit einer Parzellensämaschine (Hege 80, Fa. Hege). Pro Parzelle wurden 10 Saatzeilen auf einer Breite von 1,2 Metern und einer Länge von 10 m gelegt. Unmittelbar nach der Aussaat wurde ein Vogelschutznetz auf die Saatflächen ausgebracht. Die Bewässerung fand mit Überkopfberegnern nach Bedarf statt. Zur Unkrautregulierung wurde im Voraufbau vier Tage nach der Aussaat Butisan (Fa. BASF) mit einer Aufwandmenge von 1,5 l/ha ausgebracht. Zur Bekämpfung des Erdflöhs wurde Karate (Fa. Syngenta Agro GmbH) mit einer Aufwandmenge von 75, ml/ha appliziert.



Abb. 3: Feldanbau der Genotypen 2011

Tab. 4: Angebaute Genotypen: Herkunft, Aussaatmengen, Anbaujahr.

Gattung/Art	Sorte	Herkunft	Aussaatmenge (kg/ha)	Anbaujahr
<i>Sinapis alba</i>	Luna	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Cover	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Absolut	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Maxi	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Mikado	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Accent	P. H. Petersen	20	2010, 2011
	Samba	P. H. Petersen	20	2010, 2011
<i>Brassica juncea</i>	TerraFit	P. H. Petersen	10	2010, 2011, 2012
	Energy	P. H. Petersen	10	2010, 2011, 2012
	BRJ-101	P. H. Petersen	10	2010, 2011, 2012
	BRJ-102	P. H. Petersen	10	2010, 2011, 2012
	BRJ-103	P. H. Petersen	10	2010, 2011, 2012
	J1	Joordens Zaden	10	2012
<i>Brassica nigra</i>	M24	P. H. Petersen	10	2012
<i>Brassica carinata</i>	Utopia	Joordens Zaden	10	2012
	Carbon	Joordens Zaden	10	2012
	Cappuccino	Joordens Zaden	10	2012
<i>Raphanus sativus</i>	Defender	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Contra	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Adagio	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Consul	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Siletta Nova	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Colonel	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Picobello	P. H. Petersen	30	2010, 2011
	Commodore	P. H. Petersen	30	2010, 2011
<i>Eruca sativa</i>	ERS-1001	P. H. Petersen	5	2010, 2011
	ERS-1002	P. H. Petersen	5	2010, 2011
<i>Phacelia</i>	Angelia		16	2010, 2011, 2012

## Ernte und Aufarbeitung der Grünmassen

Die Grünmasse, d.h. Biomasse in Form von Blatt- und Sprossgewebe, wurde zum Zeitpunkt der Vollblüte geerntet. Dies entsprach nach der BBCH-Skala für Raps dem Entwicklungsstadium '65'. Tabelle 4 sind die jeweiligen Erntetermine und Standzeiten zu entnehmen.

Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Anzahl Pflanzen und die Frischmasse ermittelt. Hierzu wurden pro Parzelle alle Pflanzen eines repräsentativen Quadratmeters am Wurzelhals abgeschnitten, gezählt und anschließend gewogen.

Zusätzlich wurden jeder Parzelle drei Proben, bestehend aus jeweils 5 repräsentativen Pflanzen, entnommen. Nachdem jeweils die Frischmasse bestimmt worden war, wurden die Pflanzen komplett bei -25 °C eingefroren.

GSL-Analysen sowie Evaluierung des Biofumigationspotentials mittels Biotest setzten eine Gefrier-trocknung der Grünmasse voraus. Hierzu wurden die eingefrorenen Pflanzen einer Probe mit einer Rosenschere in ca. 5-8 cm Stücke zerkleinert. Das gesamte Probenmaterial wurde anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage (Fa. Piatkowski) für 96 Stunden gefriergetrocknet (Tab. 5).

Tab. 5: Programmparameter der Gefriertrocknung.

Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [h]
1	-24	8
2	-20	8
3	-16	8
4	-12	8
5	-8	8
6	-6	8
7	-4	8
8	-2	8
9	0	8
10	2	6
11	5	6
12	10	6
13	15	6
14	20	∞

Nach der Gefriertrocknung wurde das Probenmaterial gewogen und im Vergleich zur zuvor ermittelten Frischmasse der Wassergehalt in Prozent ermittelt. Im Anschluss wurde das Probenmaterial in einer Schneidmühle (Fa. Retsch) in ca. 1-2 mm Stücke zerkleinert, in Probenbechern abgefüllt und im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Später wurde das vorzerkleinerte Material in einer Ultra-Zentrifugalmühle (Modell: ZM 100, Fa. Retsch) auf eine Größe von < 0,5 mm vermahlen. Das gefriergetrocknete und vermahlene Grünmasse-Pulver wurde bis zur weiteren Verwendung in Glasbehältern im Exsikkator bei 4 °C gelagert.

Tab. 6: Erntetermine und Standzeiten

Gattung/Art	Sorte	2010		2011		2012	
		Ernte	Standzeit	Ernte	Standzeit	Ernte	Standzeit
<i>Sinapis alba</i>	Luna	n.a.	n.a.	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Cover	30.8.	48	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Absolut	17.9.	66	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Maxi	n.a.	n.a.	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Mikado	n.a.	n.a.	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Accent	17.9.	66	21.7.	45	n.a.	n.a.
	Samba	n.a.	n.a.	21.7.	45	n.a.	n.a.
<i>Brassica juncea</i>	Terrafit	24.8.	42	22.7.	46	9.7.	57
	Energy	24.8.	42	22.7.	46	9.7.	57
	BRJ-101	24.8.	42	22.7.	46	9.7.	57
	BRJ-102	24.8.	42	22.7.	46	9.7.	57
	BRJ-103	24.8.	42	22.7.	46	9.7.	57
	J1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	9.7.	57
<i>Brassica nigra</i>	M24	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	9.7.	57
<i>Brassica carinata</i>	Utopia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3.8.	82
	Carbon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16.7.	64
	Cappuccmino	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16.7.	64
<i>Raphanus sativus</i>	Defender	20.9.	69	1.8.	56	n.a.	n.a.
	Contra	n.a.	n.a.	5.8.	60	n.a.	n.a.
	Adagio	n.a.	n.a.	5.8.	60	n.a.	n.a.
	Consul	20.9.	69	9.8.	64	n.a.	n.a.
	Siletta Nova	n.a.	n.a.	1.8.	56	n.a.	n.a.
	Colonel	3.9.	52	1.8.	56	n.a.	n.a.
	Picobello	20.9.	69	5.8.	60	n.a.	n.a.
	Commodore	n.a.	n.a.	9.8.	64	n.a.	n.a.
<i>Eruca sativa</i>	ERS-1001	n.a.	n.a.	22.7.	46	n.a.	n.a.
	ERS-1002	n.a.	n.a.	22.7.	46	n.a.	n.a.
<i>Phacelia</i>	Angelia	20.9.	63	10.8.	65	n.a.	n.a.

n.a. = nicht angebaut

## 2.1.4.2 Herkunft und Produktion der Samenmehle

### Samenmehle 2011

Zur Herstellung verschiedener Samenmehle wurden 2011 von verschiedenen Saatzuchtunternehmen jeweils ca. 1,0 kg Saatgut verschiedener Arten und Sorten von Brassicaceae bezogen (Tab. 7).

Tab. 7: Herkunft des Saatgutes verschiedener Genotypen von Brassicaceae

Gattung/Art	Sorte	Herkunft
<i>Sinapis alba</i>	Absolut	P. H. Petersen Saatzucht
	Maxi	P. H. Petersen Saatzucht
	Accent	P. H. Petersen Saatzucht
	Samba	P. H. Petersen Saatzucht
<i>Brassica juncea</i>	TerraFit	P. H. Petersen Saatzucht
	Energy	P. H. Petersen Saatzucht
	BRJ-101	P. H. Petersen Saatzucht
	BRJ-102	P. H. Petersen Saatzucht
	BRJ-103	P. H. Petersen Saatzucht
	J1	Joordens Zaden
<i>Brassica nigra</i>	M24	P. H. Petersen Saatzucht
<i>Brassica carinata</i>	Utopia	Joordens Zaden
	Carbon	Joordens Zaden
	Cappuccino	Joordens Zaden
<i>Raphanus sativus</i>	Defender	P. H. Petersen Saatzucht
	Adagio	P. H. Petersen Saatzucht
	Siletta Nova	P. H. Petersen Saatzucht
	Picobello	P. H. Petersen Saatzucht
	Commodore	P. H. Petersen Saatzucht
<i>Eruca sativa</i>	ERS-1003	P. H. Petersen Saatzucht
<i>Brassica napus</i>	Emerald	P. H. Petersen Saatzucht
	Akela	Feldsaaten Freudenberger
	Greenland	EURO GRASS B.V.
	Molino	EURO GRASS B.V.

Von jedem Genotyp wurden 0,5 kg Saatgut in einer Ölmühle (Fa. IBG Monforts Oekotec GmbH, Type CA 59 G3) kaltgepresst (Abb. 4). Nach Abtrennung des Öls wurde der Presskuchen mittels eines Labormixers (Fa. Waring, Model 8011) zu feinerem Samenschrot zerkleinert (Abb. 5). Die sog. Samenmehle wurden bis zur weiteren Verwendung in Kunststoffbehältern im Gefrierraum bei -25 °C gelagert.



Abb. 4: Kaltpressung der Samen mittels Ölmühle



Abb. 5: Gewonnenes Samenmehl

### Samenmehle 2012

Samen der im Jahr 2012 auf dem Versuchsfeld der Hochschule angebauten Sinigrin-haltigen Sorten von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* wurde am 04.09.2012 geerntet. Hierzu wurden die schotentragenden Stängel auf insgesamt zwei Quadratmetern Anbaufläche entnommen und im Gewächshaus bei 20 °C für drei Tage luftgetrocknet. Anschließend wurde das Erntegut über Holzrahmensiebe ( $\varnothing$  3 mm) vorgesiebt, um die Samen von Stängeln und Schoten abzutrennen. In einem zweiten Schritt

wurden die Samen von weiteren feineren Verunreinigungen gereinigt. Dazu wurde das Saatgut mit Hilfe einer Saatgut-Reinigungsmaschine (Fa. A/S Rationel Kornservice, Model MLN) aufbereitet und vollständig von Fremdmaterial befreit. Nachfolgend fand wie oben beschrieben die Kaltpressung und Herstellung der Samenmehle statt.

Für die GSL-Analysen wurde alle Samenmehle wie die Grünmassen gefriergetrocknet (siehe 2.1.4.1, S.20) und dann ihr Wassergehalt bestimmt. Die gefriergetrockneten Samenmehle wurden anschließend in einer Ultra-Zentrifugenmühle (Modell ZM 100, Fa. Retsch,) mit einem Siebring von 0,5 mm zu einem feinen Pulver vermahlen, das in 50 ml Glasbehältern im Exikator bei 6 °C gelagert wurde.

### **2.1.4.3 Analyse der Glucosinolat-Gehalte der Biomassen**

Teilmengen der vermahlenden Grünmasse- und Samenmehl-Proben (ca. 10 mg) wurden dreifach in 1,0 ml 80 % Methanol extrahiert nachdem zuvor ein entsprechender interner Standard zugegeben worden war in Form von benzyl-GSL für *B. juncea*-Proben, sowie 2-propenyl-GSL für *S. alba*, *R. sativus* und *E. sativa*-Proben. Die GSL wurden von PhytoPlan, Heidelberg bezogen. Nach Zentrifugation wurden die Überstände in Säulen mit Diethylaminoethyl Sephadex A 25 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) pipettiert. Gereinigte Sulfatase [E.C. 3.1.6.1, 'type H-1, from *Helix pomatia*, 15,100 units von Sigma, Taufkirchen] wurde zur Desulfatisierung der GSL appliziert. Die desulfatisierten GSL wurden nach Abdalsamee und Müller (2012) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, 1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mittels der Säule Supelcosil LC 18 (3 µm, 150x3 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) analysiert.

Die Identifizierung der GSL wurde durch Vergleich mit den Standards sowie mittels ultra-HPLC in Kombination mit einem Massenspektrometer (1290 Infinity uHPLC and 6210 ToF-MS Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) vorgenommen. Zur Quantifizierung der GSL wurden Peaks bei 229 nm sowie die in Relation zu den internen Standards errechneten Konzentrationen unter Nutzung der von Müller et al. (2001) verwendeten Retentionszeiten.

### **2.1.4.4 Ermittlung der Freisetzung von Isothiocyanaten**

Die Quantifizierung der tatsächlichen ITC-Freisetzung GSL-haltiger Biomasse-Proben erfolgte nach Zhang et al. (1992) mittels spektralphotometrischer Detektion von 1,3-Benzodithiol-2-thion nach zuvor erfolgter Derivatisierung der ITC mittels 1,2-Benzenedithiol. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Freisetzung von 2-propenyl-ITC aus Sinigrin-haltigen Samenmehlen untersucht.

### Maximale ITC-Freisetzung von Samenmehlen

Hierzu wurden vermahlene Samenmehlproben (50 mg) mit 10 ml sterilem Aqua dest. und 10 ml Methanol in Duranflaschen (75 ml) überführt und für 24 h auf einem Horizontalschüttler bei 150 U/min bewegt. Die durch Hydrolyse freigesetzten ITC wurden in Methanol gebunden. Das Gemisch wurde über einen Faltenfilter geklärt und anschließend nochmals über einen Spritzenvorsatzfilter (hw3, 0,2 µm) mit PTFE-Membran gefiltert.

Die Derivatisierung der ITC im gewonnenen SM-Extrakt erfolgte in einem Gemisch aus Methanol, 100 mM Dikaliumhydrogenphosphat-Pufferlösung sowie 80 mM 1,2-Benzenedithiol als Derivatisierungsreagenz. Zunächst wurden 100 µl des SM-Extrakts in einen 2 ml Messkolben pipettiert. Darauf folgte die Zugabe von 900 µl der Pufferlösung sowie 100 µl des in Methanol gelösten Derivatisierungsmittels:

900 µl	100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Puffer (pH 8,5)
900 µl	Methanol
100 µl	Biomasseextrakt in MeOH-H <sub>2</sub> O Gemisch
100 µl	80 mM 1,2 benzenedithiol in MeOH

---

2000 µl    Gesamtvolumen

Nachdem das Gemisch mit Methanol auf 2 ml aufgefüllt worden war, wurde das Gefäß geschüttelt und für 60 Minuten in ein 60 °C warmes Wasserbad gestellt. Nach der Derivatisierung wurde die Probe bei Raumtemperatur abgekühlt und in Halbmikroküvetten überführt. Die Messung erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von 365 nm in einem Spektralphotometer. Pro Genotyp wurden drei Wiederholungen angesetzt.

Zur Kalibrierung des Systems waren zuvor sechs Standards gemessen worden. Die Standards enthielten Konzentrationen von 2-propenyl-ITC zwischen 1,25-40,0 µmol/l. Hierzu wurden einem Gemisch von 100 µl Derivatisierungsreagenz sowie 900 µl Pufferlösung die entsprechenden ITC-Mengen (Standardadditionen) zugegeben und die Probengemische mit Methanol auf 2 ml aufgefüllt. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben. Die Standards wiesen im Vergleich zu Zhang et al. (1992) ähnliche Messwerte auf, die in mehreren Wiederholungen reproduziert werden konnten (Abb. 6). Zusätzlich wurde der Matrixeffekt der Probe auf die Messung ermittelt. Hier wurden Proben des Samenmehls einer Sorte von *B. juncea* und *B. carinata* wie oben beschrieben hydrolysiert und derivatisiert bevor die Standardadditionen mit 2-propenyl-ITC zugegeben wurden und Messungen erfolgten. Es wurden in mehreren Versuchsreihen Matrixeffekte für Samenmehlproben von *B. juncea* und *B. carinata* von 4,935 bzw. 7,213 µM/Probe ermittelt und bei der Berechnung der Konzentrationen entsprechend berücksichtigt.

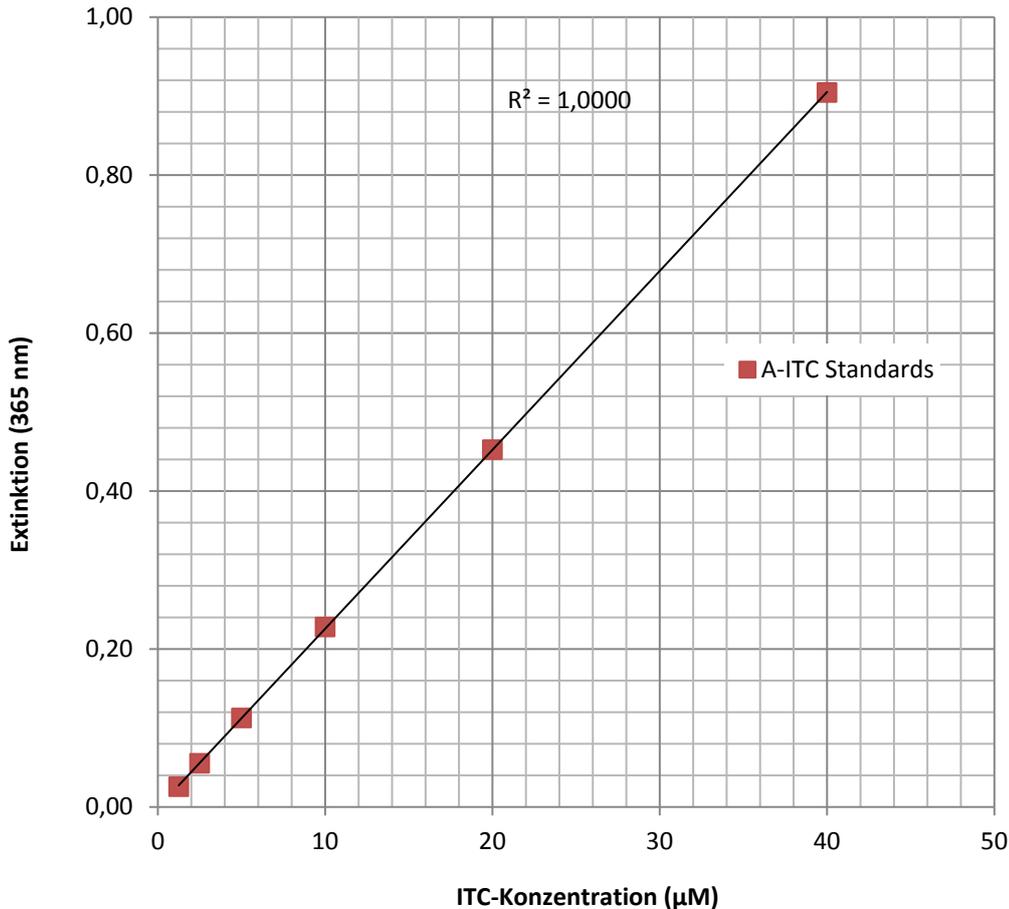


Abb. 6: Spektralphotometrische Bestimmung von 2-propenyl-ITC nach der Reaktion von 1,2-benedithiol zu 1,3-benzodithiole-2-thione (Eichreihe).

#### ITC-Freisetzung des Samenmehls von *B. juncea* 'Energy' im Biotest

Die Freisetzung von 2-propenyl-ITC des Samenmehls der Sorte *B. juncea* 'Energy' sollte im Biotestsystem über einen 48stündigen Zeitraum in sterilem Quarzsand sowie in den natürlichen Böden 1 und 5 (siehe Tab. 13) nach einer Applikation mit einer Dosis von 0,4 Vol.-% erfasst werden. Die Versuchsanstellung folgte zunächst der unter 2.1.4.5. sowie 2.1.4.7 (S. 32) beschriebenen Vorgehensweise.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h wurden die Gläser geöffnet und jeweils 75 g des Bodens entnommen und mit 30 ml Methanol in eine Glasflasche gegeben. Um die ITC-Verbindungen im Methanol zu binden, wurden die Glasflaschen bei 400 U/Min. für 1 h auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Anschließend wurde der Probe über einem Bücherfilter und einem Filterpapier (hw3), mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, die Methanol-Lösung entzogen und aufgefangen. Der Methanol-Extrakt wurde anschließend über einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm, PTFE, Fa. Satorius) weiter gereinigt bevor sich die Derivatisierung der ITC-Verbindungen und ihre spektralphoto-

tometrische Detektion anschloss (s.o.). Pro Zeitpunkt und Boden wurden drei Wiederholungen angelegt. Für jeden Boden (Quarzsand, Boden 1 und 5) wurde vorab der Matrixeffekt auf die Messung mit Hilfe von Standardadditionen in mehreren Versuchsreihen bestimmt und später bei den Berechnungen berücksichtigt.

#### 2.1.4.5 Evaluierung der Wirkung der Biomassen mittels Biotest im Quarzsand

Um in kurzer Zeit mit vertretbarem Aufwand das Biofumigationspotential der Grünmasse und Samenmehle verschiedener Genotypen vergleichend und reproduzierbar ermitteln zu können, wurde in zahlreichen Vorversuchen ein standardisierter Laborbiotest entwickelt und angewendet.

##### Versuche mit Grünmasse

Hierzu wurden gasdichte Glasbehälter (250 ml, Fa. Weck) verwendet, in die jeweils 200 g eines mit Mikrosklerotien verseuchten Quarzsandes (200 MS/g Sand) eingefüllt wurden (siehe 2.1.1, S. 14). Anschließend erfolgte das Einmischen der Grünmasse des zu prüfenden Genotyps in Form des gefriergetrockneten, vermahlenden Grünmasse-Pulvers (siehe 2.1.4.1, S. 20) und in einer Menge wie sie in Annäherung der Feldsituation entsprach. Als Grundlage für die applizierte Menge dienten die durchschnittlichen Biomasseerträge der verschiedenen Gattungen. Für die Gattungen *Brassica*, *Sinapis* und *Eruca* wurde ein durchschnittlicher Frischmasseertrag von 3,0 kg/ha sowie für *Raphanus* von 6,0 kg/ha festgelegt. Unter Einbeziehung der im Rahmen der Gefriertrocknung ermittelten durchschnittlichen Wassergehalte der Biomassen (*Brassica*, *Sinapis*, *Eruca* = 84 %, *Rhapahus* = 88 %), der Annahme einer Einarbeitungstiefe von 10 cm sowie der Dichte des Quarzsandes (1,587 g/cm<sup>3</sup>) wurden die pro Gefäß applizierten Mengen berechnet bzw. festgelegt (Tab. 8). Anschließend wurde die Grünmasse sorgfältig mit dem trockenen Quarzsand vermischt (Abb. 7, links und Mitte).

Um einen optimalen Ablauf der Hydrolyse zu gewährleisten wurde in einem nächsten Schritt steriles Leitungswasser zugegeben. Zunächst galt es eine Wasserhaltekapazität von 60 % der  $WK_{\max}$  einzustellen. Dies entsprach einer Menge von 27,6 ml Wasser/200 g Quarzsand bzw. Gefäß. Zudem wurde jener Wasseranteil der Grünmasse, der durch die Gefriertrocknung entzogen worden war, zugegeben. Die verabreichten Wassermengen auf der Grundlage der durchschnittlichen Wassergehalte der Grünmassen (s.o.) betragen 3,2 und 6,6 ml/Gefäß. Nach der Wasserzugabe wurde der Quarzsand erneut sorgfältig durchmischt, um eine gleichmäßige Feuchteverteilung zu gewährleisten (Abb. 7, rechts). Anschließend wurden die Glasgefäße mit einem Deckel sowie Parafilm verschlossen und für 48 h bei 20 °C im Klimaschrank aufgestellt. Nach der Inkubation wurde das Quarzsand-Biomasse-Gemisch eines jeden Gefäßes in eine Aluschale überführt und bei 20 °C im Gewächshaus getrocknet. Der anschließende Nachweis keimfähiger Mikrosklerotien erfolgte mittels eines Nasssiebeverfahrens

unter Verwendung eines selektiven Pektatnährbodens nach der Methode von Neubauer und Heitmann (2011). Gefäße ohne grüne Biomasse oder mit der Glucosinolat-freien Biomasse von *Phacelia* dienten als Standardkontrollen. In weiteren Versuchen wurde autoklavierte Grünmasse von *Brassica*-Genotypen mit inaktiviertem GSL-Myrosinase-System eingesetzt. Alle Varianten wurden vierfach wiederholt.

Tab. 8: Im Biotest verwendete Grünmasse- und Wassermengen.

Gattung	Grünmasse- Pulver (g/Gefäß)	entspricht Frischmasse <sup>1</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> O-Zugabe (ml/Gefäß)		
			für WK 60%	Anteil Biomasse	Gesamt
<i>Brassica</i> sp.	0,6	2,98	27,6	3,2	30,8
<i>Raphanus</i>	0,9	5,95	27,6	6,6	34,2
<i>Sinapis</i>	0,6	2,98	27,6	3,2	30,8
<i>Eruca</i>	0,6	2,98	27,6	3,2	30,8
<i>Phacelia</i>	0,9	5,95	27,6	3,2	30,8

<sup>1</sup> bei Einarbeitungstiefe 10 cm, Dichte Quarzsand: 1,5873 g/cm<sup>3</sup>



Abb. 7: Biotest: Einarbeitung gefriergetrockneter vermahlener Grünmasse

### Versuche mit Samenmehlen

Die Versuche wurden in gleicher Weise durchgeführt (s.o.). Hierbei wurde das vermahlene Samenmehl eines zu prüfenden Genotyps in den mit MS verseuchten Quarzsand gemischt. Alle Samenmehle wurden in einer Dosis von 0,4 Vol.-% zugemischt. Dies entsprach 252 mg Samenmehl pro Gefäß. Anschließend wurde eine Substratfeuchte eingestellt, die 60 % der max. Wasserkapazität des Quarzsandes entsprach. Hierzu wurden 27,6 ml steriles Leitungswasser pro Gefäß appliziert. Die weitere

Vorgehensweise entsprach den Versuchen mit Grünmassen (s. o.). In Vorversuchen hatte sich die Applikation von autoklaviertem Samenmehl als geeignete Kontrolle erwiesen. Deshalb wurden Gefäße mit autoklaviertem Samenmehl von *B. juncea*, *S. alba* und *R. sativus* in einer Dosis von 0,4 Vol.-% angelegt. Alle Varianten wurden vierfach wiederholt.

Tab. 9: Im Biotest verwendete Samenmehl- und Wassermengen.

Gattung	Samenmehl (mg/Gefäß)	entspricht Samenmehl <sup>1</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> O- Zugabe für WK 60 % (ml/Gefäß)
<i>Brassica</i> sp.	252	0,2	27,6
<i>Raphanus</i>	252	0,2	27,6
<i>Sinapis</i>	252	0,2	27,6
<i>Eruca</i>	252	0,2	27,6

<sup>1</sup> bei Einarbeitungstiefe 10 cm, Dichte Quarzsand: 1,5873 g/cm<sup>3</sup>

#### 2.1.4.6 Einfluss der Biomassen auf die Wirkung freigesetzter Isothiocyanate

In ergänzenden Versuchen wurde der Einfluss der applizierten Biomasse (Grünmasse oder Samenmehl) auf die Wirkung freigesetzter ITC im verwendeten Biotestsystem (Abb. 7) untersucht. Hier wurde in einer Variante eine pure ITC-Verbindung appliziert und in einer weiteren Vergleichsvariante die pure ITC-Menge mit einer autoklavierten Biomasse kombiniert, die diese ITC-Menge generieren könnte. Beide Varianten wurden zusätzlich mit einer unbehandelten Variante verglichen.

##### Einfluss Grünmasse

Es wurden Versuche mit 2-propenyl-ITC und der Grünmasse von *B. juncea* 'Energy' sowie benzyl-ITC und der Grünmasse von *S. alba* 'Accent' durchgeführt. Die ITC-Mengen wurden auf der Grundlage der toxikologischen Studien so gewählt, dass Wirkungen zwischen 80-100 % zu erwarten waren. Folgende ITC-Stammlösungen wurden angesetzt:

1. 80 µl 2-propenyl-ITC, 6 ml Methanol, 93,92 ml Aqua dest.
2. 60 µl benzyl-ITC, 3 ml Methanol, 46,94 ml Aqua dest.

Nach dem Einmischen der Komponenten in den Quarzsand erfolgte die weitere Versuchsdurchführung wie unter 2.1.4.5 beschrieben (Tab. 10).

Tab. 10: Versuchsdurchführung - Einfluss Grünmasse auf Wirkung zweier ITC

	ITC-Menge (nmol/g QS)	ITC-Menge ( $\mu$ l/Gefäß)	Stammlösung ( $\mu$ l)	Grünmasse autoklaviert (g/Gefäß)	WK <sub>60%</sub> ( $\mu$ l H <sub>2</sub> O/Gefäß)	Methanol ( $\mu$ l/Gefäß)
Versuch 2-propenyl-ITC						
Kontrolle	0	0	0	0	27,6	0
2-propenyl	50	0,974	1.218	0	27,6	73,08
2-propenyl +Biomasse	50	0,974	1.218	0,6 `Energy`	27,6 + 3,2	73,08
Versuch benzyl-ITC						
Kontrolle	0	0	0	0	27,6	0
benzyl	10	0,265	221	0	27,6	13,26
Benzyl +Biomasse	10	0,265	221	0,6 `Accent`	27,6 +3.2	13,26

### Einfluss Samenmehle

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Biomasse eines Samenmehls von *B. juncea* `Terrafit` auf die Wirkung von 2-propenyl-ITC untersucht (Tab. 11). Folgende Stammlösung wurde angesetzt:

40  $\mu$ l 2-propenyl-ITC, 3 ml Methanol + 46,96 ml Aqua dest.

Tab. 11: Versuchsdurchführung - Einfluss Samenmehl auf Wirkung von 2-propenyl-ITC

	ITC-Menge (nmol/g QS)	ITC-Menge ( $\mu$ l/Gefäß)	Stammlösung ( $\mu$ l)	Samenmehl autoklaviert (mg/Gefäß)	WK <sub>60%</sub> ( $\mu$ l H <sub>2</sub> O/Gefäß)	Methanol ( $\mu$ l/Gefäß)
Versuch 2-propenyl-ITC						
Kontrolle	0	0	0	0	27,6	0
2-propenyl	50	0,974	1,218	0	27,6	73,08
2-propenyl +Biomasse	50	0,974	1,218	63 `Terrafit`	27,6 + 3,2	73,08

### 2.1.4.7 Evaluierung der Wirkung von Biomassen mittels Biotest in Böden

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von grüner Biomasse bzw. Samenmehlen ausgewählter Genotypen in natürlich mit *Verticillium* belasteten Böden untersucht. Hierzu waren zuvor auf sechs verseuchten Standorten Bodenproben gezogen worden. Die Bodenproben wurden luftgetrocknet und durch ein 2 mm Analysesieb (Fa. Retsch) homogenisiert. Die Bodenart wurde mittels Fingerprobe,  $C_{\text{org}}$ -Gehalt und pH-Wert nach den Methoden der AG Boden (2005) ermittelt (Tab. 12).

Tab. 12: Herkunft der natürlichen Böden und ihre Eigenschaften

Nr.	Herkunft	Mikrosklerotien- Belastung (MS/g Boden)		Bodenart	ph-Wert	$C_{\text{org}}$
1	Hochschule Osnabrück	8,0	Su3	schluffiger Sand	6,0	1,06
2	Borgmeyer Dissen	73,2	Su3	schluffiger Sand	5,1	1,04
3	Soeffken Martfeld	58,0	Su2	schwach schluffiger Sand	5,9	1,70
4	Lüske Bethen	26,8	Su4	stark schluffiger Sand	5,5	2,80
5	Aumüller Garrel	54,8	Ss	Sand	5,2	3,23
6	Sennekamp Senden	46,0	Ss	Sand	5,5	3,57

Der Versuchsablauf entsprach weitgehend dem Biotest unter Verwendung von Quarzsand (Abb. 6) mit jeweils 200 g luftgetrocknetem Boden pro Gefäß.

#### Versuche mit Grünmasse

Im Falle der grünen Biomasse wurde gefriergetrocknetes, vermahlendes Pulver der *B. juncea*-Sorte 'Energy' mit 0,6 g/Gefäß (= 3,0 kg FM/m<sup>2</sup>), eine der Praxis entsprechende Aufwandmenge geprüft. Durch Zugabe von sterilem Leitungswasser wurde eine Feuchtigkeit eingestellt, die 60 % der max. Wasserkapazität von Boden 1 entsprach (Richtwert  $WK_{\text{max}}$  von Boden 1;  $WK_{60\%} = 17 \text{ ml}/100 \text{ g Boden}$ ). Dies entsprach 34 ml/Gefäß. Im Falle des Bodens 4 wurden abweichend 38 ml/Gefäß appliziert. Entsprechend dem durchschnittlichen Wassergehalt der Frischmasse von 84,0 % wurden als Aus-

gleich zur applizierten gefriergetrockneten Grünmasse jeweils 3,2 ml Wasser/Gefäß appliziert. Kontrollen enthielten *Phacelia*-Grünmasse. Alle Versuchsglieder wurden vierfach wiederholt.

### Versuche mit Samenmehlen

Samenmehl der *B. juncea*-Sorte 'Energy' wurden in unterschiedlichen Aufwandmengen im Quarzsand und in den natürlich verseuchten Böden 1-6 geprüft (Tab. 13). Als Kontrollen dienten Gefäße mit autoklaviertem Samenmehl der gleichen Sorte in jeweils höchster Aufwandmenge (0,3 bzw. 0,8 Vol.-%). Alle Varianten wurden vierfach wiederholt.

Tab. 13: Versuche mit Samenmehl *B. juncea* 'Energy' in unterschiedlichen Aufwandmengen

Samenmehl Konzentration (Vol.-%)	Samenmehl (mg/Gefäß)	entspricht Samenmehl <sup>1</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> O-Zugabe für WK 60 % (ml/Gefäß)
Versuch in Quarzsand			
0,05	31,5	0,025	34,0
0,1	63,0	0,05	34,0
0,2	126	0,1	34,0
0,3	189	0,15	34,0
Versuch in Böden 1-6			
0,2	148	0,1	34,0 <sup>2</sup>
0,4	296	0,2	34,0 <sup>2</sup>
0,8	592	0,4	34,0 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> bei Einarbeitungstiefe 10 cm, Dichte Quarzsand: 1,5873 g/cm<sup>3</sup>, Dichte Böden: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

<sup>2</sup> in Boden 4: + 4 ml

#### **2.1.4.8 Nicht-GSL-abhängige Wirkung von Samenmehlen**

Die nicht GSL-abhängige Wirkung eines Sinigrin-haltigen Samenmehls wurde im Quarzsand sowie unterschiedlichen Böden untersucht. Hierzu wurde das GSL-Myrosinase-System des Samenmehls von *B. juncea* '101' zuvor auf zweierlei Art und Weise ausgeschaltet. In einer Variante wurde es bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend bei 105 °C für 2 h im Sterilschrank getrocknet. Darüber hinaus wurde es nach Elberson et al. (1996) durch zuvor eingeleitete Hydrolyse entgiftet. Hierzu war Samenmehl in eine Petrischale eingefüllt und mit 3,0 ml H<sub>2</sub>O/g Samenmehl versetzt worden. Danach wurde die Petrischale für 48 h verschlossen. Zur Belüftung wurde der Deckel mit Löchern versehen. Das Samenmehl trocknete anschließend an der Luft. Die Versuchsdurchführung (Tab. 14) entsprach der unter 2.1.4.5 dargestellten Vorgehensweise.

Tab. 14: Versuch zur Wirkung von autoklaviertem und entgiftetem Samenmehl der *B. juncea*-Sorte '101' mit 0,1 Vol.-% in Quarzsand und natürlichen Böden.

Variante	Samenmehl (mg/Gefäß)	entspricht Samenmehl <sup>1</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> O-Zugabe für WK 60% (ml/Gefäß)
Versuch in Quarzsand			
Kontrolle	0		
Samenmehl autoklaviert	63,0	0,05	27,0
Samenmehl entgiftet	63,0	0,05	27,0
Versuch in Böden 1,3,4			
Kontrolle	0		34,0
Samenmehl autoklaviert	74,0	0,05	34,0
Samenmehl entgiftet	74,0	0,05	34,0

<sup>1</sup> bei Einarbeitungstiefe 10 cm, Dichte Quarzsand: 1,5873 g/cm<sup>3</sup>, Dichte Böden: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

## 2.2 Praxisversuche

### 2.2.1 Standort Schifferstadt

#### Freilandversuch 2011

Vom Kooperationspartner Lehr- und Versuchsbetrieb Queckbrunner Hof des DLR Rheinpfalz wurde 2011 in Zusammenarbeit mit der Hochschule Osnabrück ein Freilandversuch angelegt. Unter praxisnahen Bedingungen war die Biofumigationswirkung der Grünmasse zweier Sorten von *B. juncea* bzw. *R. sativus* zu prüfen. Zusätzlich wurde die Ausbringung eines Samenmehls von *B. juncea* geprüft. Als Kontrollen diente eine Schwarzbrache sowie eine Variante, in der Glucosinolat-freie Biomasse einer *Phacelia*-Gründüngung in den Boden eingearbeitet wurde. Zur Unkrautregulierung wurden 4-7 Tage nach der Aussaat 1,5 l Butisan im VA ausgebracht. Die Regulierung des Kohlerdflohs erfolgte mittels Karate. Eine Bewässerung erfolgte nach Bedarf.

Vor der Aussaat wurden alle Parzellen hinsichtlich ihres Ausgangsverseuchungsgrades untersucht. Hierzu wurden pro Parzelle mittels eines Bohrstockes 25 zufällig und gleichmäßig verteilte Einstiche bis zu einer Tiefe von 15 cm entnommen. Von der hergestellten Mischprobe wurden ca. 500 cm<sup>3</sup> Boden für die Analyse zur Hochschule Osnabrück geschickt. Der Nachweis von *Verticillium* erfolgte mit den Nasssiebverfahren nach Neubauer und Heitmann (2011). Die ermittelten durchschnittlichen

Verseuchungsgrade der Parzellen variierten zwischen 6,4 und 32,4 MS/g Boden. Die einzelnen Wiederholungen der Varianten wurden anschließend so auf die Parzellen verteilt, dass alle Varianten eine durchschnittliche Ausgangsbelastung von 16,0-20,6 MS/g Boden aufwiesen.

Die Versuchsdaten sind Tab. 15 zu entnehmen. Zum Zeitpunkt der Vollblüte wurde die Biomasse mittels eines Mulchers zerkleinert und unmittelbar eingeprüft (Abb. 8). Anschließend erfolgte eine intensive Bewässerung der Versuchsfläche. Am 4.8. wurde als Nachfolge-Kultur eine gegenüber *Verticillium* anfällige Romanesco-Sorte gepflanzt. Mitte August erfolgte eine weitere *Verticillium*-Beprobung aller Parzellen. Am 11.10. wurde jeweils der Strunk von 20 Pflanzen pro Parzelle nach einem Boniturschema (0-5) auf *Verticillium*-Befall visuell bonitiert.



Abb.8: Freilandversuch Schifferstadt 2011: Versuchsfläche (a), Mulch-und Einfräsvorgang (b), zerkleinerte Biomasse (c), Versuchsfläche nach dem Einfräßen der Biomasse (d).

Tab. 15: Freilandversuch Schifferstadt 2011

Varianten	Aussaat-/ Aufwandmenge
Kontrolle Schwarzbrache	
Kontrolle <i>Phacelia</i> `Angelia´	12,0 kg/ha
<i>B. juncea</i> `Terrafit´	14 kg/ha
<i>R. sativus</i> `Defender´	30 kg/ha
<i>B. juncea</i> `Terrafit´ (Samenmehl)	0,2 kg/m <sup>2</sup>
<b>Versuchsanlage</b>	
Parzellengröße: 10 x 7,5 m	Aussaat: 31.5.2011
Anzahl Parzellen/Variante: 4	Mulchen/Einarbeiten: 25.7.2011
Düngung: Entec 26 (26 % N, 13 % S), 230 kg/ha = 60 kg N/ha, 30 kg S/ha	
<b>MS-Verseuchung</b> (Natürliche Belastung)	
Vorbeprobung: 11.5.	Nachbeprobung: 11.8.
<b>Anschließende Kultur</b>	
Romaneso `Celio´	Pflanzung: 4.8.
Bonituren: 11.10.2011	Ernte: 17.10.

### Gewächshausversuch 2012

Zusätzlich wurde 2012 vom gleichen Partner in einem Gewächshaus ein Samenmehlversuch mit gestaffelten Aufwandmengen durchgeführt (Tab. 16). Neben einer Schwarzbrache wurde eine Bodendämpfung als Vergleichsvariante angelegt. Die Fläche wies eine natürliche *Verticillium*-Belastung auf. Vor Versuchsbeginn wurden alle Parzellen hinsichtlich ihres Ausgangsverseuchungsgrades untersucht (siehe Freilandversuch). Die Fläche erwies sich als sehr ungleichmäßig verseucht. Die ermittelten durchschnittlichen Verseuchungsgrade der Parzellen variierten zwischen 0,4 und 15,2 MS/g Boden. Die einzelnen Wiederholungen der Varianten wurden anschließend so auf die Parzellen verteilt, dass alle Varianten eine durchschnittliche Ausgangsbelastung von 3,5-7,8 MS/g Boden aufwiesen.

Das ausgebrachte Samenmehl wurde anschließend unmittelbar in den Boden eingefräst, bevor eine Bewässerung erfolgte. Am 6.8. wurde eine gegenüber *Verticillium* anfällige Rettich-Sorte gepflanzt. Mitte August erfolgte eine weitere *Verticillium*-Beprobung aller Parzellen. Am Erntetermin wurden Wurzeln und Blätter von jeweils 50 Pflanzen pro Parzelle nach einem Boniturschema (0-9) auf *Verticillium*-Schädigungen visuell bonitiert. Zusätzlich wurde das Wurzelgewicht ermittelt.

Tab. 16: Gewächshausversuch Schifferstadt 2012

<b>Varianten</b>	<b>Aufwandmenge</b>
Kontrolle Schwarzbrache	
Dämpfung, 10 Bodentiefe	
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	0,10 kg/m <sup>2</sup>
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	0,25 kg/m <sup>2</sup>
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	0,50 kg/m <sup>2</sup>
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	1,00 kg/m <sup>2</sup>
<b>Versuchsanlage</b>	
Parzellengröße: 8 m <sup>2</sup>	Aussaat: ----
Anzahl Parzellen/Variante: 4	Ausbringung und Einarbeitung: 20.7.12
<b>MS-Verseuchung</b>	
Natürliche Belastung	
Vorbeprobung: 6/2012	Nachbeprobung: 8/2012
<b>Anschließende Kultur</b>	
Rettich, Sorte `Sepp´	Pflanzung: 6.8.2012 Ernte: 9.10.2012
Bonituren: Wurzel- und Blattbonitur (1-9), Schadensklassen am 9.10.2012	

## 2.2.2 Standort Langförden

### Freilandversuch 2011

Der Kooperationspartner VBOG Langförden der LWK Niedersachsen führte 2011 einen ähnlichen Versuch wie in Schifferstadt durch. In der Vorbeprobung erwies sich die zur Verfügung stehende Fläche als nur sehr gering belastet. Vor diesem Hintergrund wurde die Biofumigationswirkung der Varianten anhand vergrabener Inokulumbeutel erfasst. Hierzu wurde getrockneter Boden des Versuchsortes mit MS-Quarzmehl-Inokulum (56.000 cfu/g) künstlich verseucht. Jeweils 30 g des mit ca. 200 MS/g belasteten Bodens wurden in kleine Nylonbeutel gefüllt, von denen jeweils 10 Beutel unmittelbar nach dem Anwalzen der Versuchsfläche gleichmäßig auf der Parzelle 10 cm tief vergraben wurden (Abb. 9f). Die Versuchsdaten sind Tab. 17 zu entnehmen. Zur Unkrautbekämpfung wurden 1,5l Butisan ausgebracht. Die Zerkleinerung der Biomasse erfolgte mittels eines Schlegelmulchers (Abb. 9c). Nach dem Anwalzen wurde intensiv bewässert. Nach 14 Tagen wurden die Inokulumbeutel ausgegraben. Der Inhalt aller Beutel einer Parzelle wurde vereinigt, getrocknet und mit dem Nasssiebverfahren auf keimfähige Mikrosklerotien untersucht. Im Mai des darauffolgenden Jahres wurden Erdbeeren gepflanzt. Eine Bonitur der Pflanzen wurde nicht durchgeführt.



Abb. 9: Freilandversuch Langförden 2011

Versuchsfläche (a), Mulchvorgang (b), Zerkleinerung der Biomasse mittels Schlegelmulcher (c), Einfräsen der Biomasse (d), ausgebrachtes Samenmehl vor Einarbeitung (e), Vergraben der Inokulumbeutel (f), Versuchsfläche nach dem Anwalzen (g).

Tab. 17: Freilandversuch Langförden 2011

<b>Varianten</b>	<b>Aussaat-/ Aufwandmenge</b>
Kontrolle Schwarzbrache	
Kontrolle <i>Phacelia</i>	12,0 kg/ha
<i>B. juncea</i> `Terrafit`	10 kg/ha
<i>R. sativus</i> `Defender`	30 kg/ha
<i>B. juncea</i> `Terrafit` (Samenmehl)	0,2 kg/m <sup>2</sup>
<b>Versuchsanlage</b>	
Parzellengröße: 5,5 x 7,5 m	Aussaat: 28.6.2011
Anzahl Parzellen/Variante: 4	Mulchen/Einarbeiten: 26.7.2011
<b>MS-Verseuchung</b> (Künstlich mit Inokulumentel)	
Vorbeprobung: -----	Nachbeprobung Inokulumentel: 8/2011
Düngung: NovaTecN-Max, 27,5 kg/Versuchsfläche	
<b>Anschließende Kultur</b>	
Erdbeeren `Elsanta`	Pflanzung: 9.5.2012
Bonituren: keine	Ernte: 2012/2013

### 2.2.3 Standort Osnabrück

2013 wurde auf der Versuchsfläche `Wulfeskamp` der Hochschule Osnabrück ein Freilandversuch durchgeführt mit dem Ziel, die Biofumigationswirkung zweier Aufwandmengen eines Samenmehls der *B. juncea*-Sorte `Energy` zu prüfen (Tab. 18).

Da die zur Verfügung stehende Fläche eine zu geringe Ausgangsbelastung mit *Verticillium* aufwies, wurde sie durch Ausbringung von MS-Quarzsand-Inokulum künstlich verseucht. Drei Wochen vor Versuchbeginn wurde pro Parzelle jeweils eine Kernparzelle von 1,5 m<sup>2</sup> mit 10 Einstichen beprobt und auf Mikrosklerotien untersucht. Die ermittelten durchschnittlichen Verseuchungsgrade variierten zwischen 2,4 und 10,0 MS/g Boden. Die einzelnen Wiederholungen der Varianten wurden anschließend so auf die Parzellen verteilt, dass alle Varianten eine durchschnittliche Ausgangsbelastung von 6,0-7,0 MS/g Boden aufwiesen.

Das Samenmehl wurde nach der Ausbringung unmittelbar mittels einer Fräse bis zu einer Bodentiefe von 12,5 cm eingearbeitet. Anschließend erfolgte ein Anwalzen der Fläche bevor sie beregnet wurde (5 l/m<sup>2</sup>). Die Parzellen der Variante 3 wurden zusätzlich mit einer gasdichten Folie abgedeckt, um die Verweildauer der ITC-Verbindungen zu erhöhen (Abb. 10). Sieben Tage nach der Ausbringung des

Samenmehls wurden die Parzellen wiederholt beprobt und auf ihre Mikrosklerotien-Belastung hin untersucht.

Tab. 18: Freilandversuch Osnabrück 2013

<b>Varianten</b>	<b>Aufwandmenge</b>
Kontrolle, Schwarzbrache	--
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	0,5 kg/m <sup>2</sup>
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl (mit Folienabdeckung)	0,5 kg/m <sup>2</sup>
<i>B. juncea</i> `Energy´ Samenmehl	1,0 kg/m <sup>2</sup>
<b>Versuchsanlage</b>	
Parzellengröße: 5 m <sup>2</sup>	Aussaat: ---
Anzahl Parzellen/Variante: 4	Ausbringung/Einarbeitung: 20.7.13
<b>MS-Verseuchung</b>	
Künstliche Verseuchung mit MS-Quarzsand	
Vorbeprobung: 1.7.2013	Nachbeprobung: 27.7.2013



Abb. 10: Freilandversuch Osnabrück 2013

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Toxizität von Isothiocyanaten in sterilem Sand

Als Grundlage für die Bewertung des Biofumigationspotentials von Grünmassen und Samenmehlen wurde die Toxizität verschiedener Isothiocyanate gegenüber Mikrosklerotien von *Verticillium* vergleicht in einem Biotest unter sterilen Bedingungen und Ausschluss störender Einflussfaktoren ermittelt. Auf der Grundlagen der beobachteten Dosis-Wirkungskurven (Abb. 11) konnten mittels einer Probitanalyse die Dosis-Wirkungsbeziehungen bzw. LD-Werte als toxikologische Vergleichsparameter geschätzt werden (Tab. 19, Tab. 20).

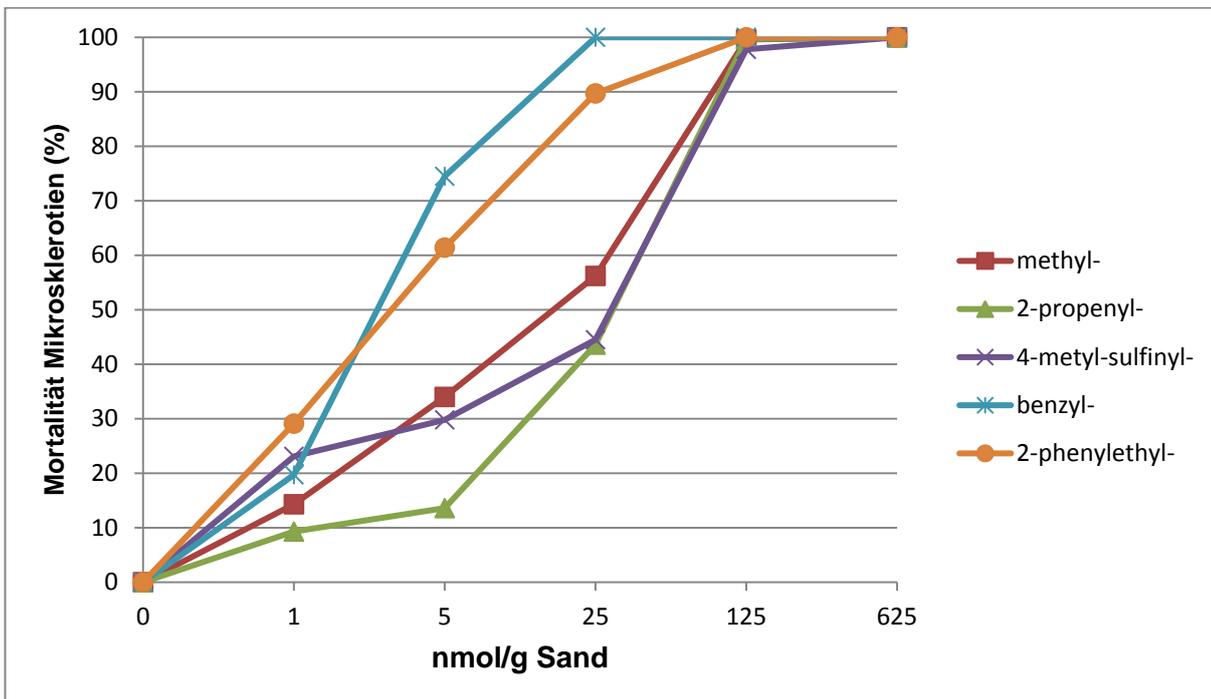


Abb. 11: Dosis-Wirkungskurven verschiedener Isothiocyanate in sterilem Sand

Tab. 19: Toxizität der Isothiocyanate gegenüber Mikrosklerotien – Mittels Probit-Analyse berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehung

Wirkung (%) (Probits)	2-propenyl-			methyl-			4-methylsulfinyl-3-butenyl			benzyl-			phenylethyl-		
	Konz.	95%- Konfidenzintervall		Konz.	95%- Konfidenzintervall		Konz.	95%- Konfidenzintervall		Konz.	95%- Konfidenzintervall		Konz.	95%- Konfidenzintervall	
		Untegr.	Obergr.		Untegr.	Obergr.		Untegr.	Obergr.		Untegr.	Obergr.		Untegr.	Obergr.
0,05	1,4	0,6	2,5	0,6	0,2	1,0	0,3	0,1	0,8	0,5	0,3	0,6	0,2	0,1	0,4
0,10	2,4	1,2	3,8	1,1	0,5	1,8	0,7	0,2	1,5	0,7	0,5	0,9	0,3	0,1	0,6
0,15	3,4	1,8	5,2	1,6	0,9	2,5	1,2	0,4	2,4	0,9	0,7	1,1	0,5	0,2	0,8
0,20	4,4	2,6	6,7	2,3	1,3	3,4	1,8	0,7	3,4	1,1	0,8	1,3	0,7	0,3	1,1
0,25	5,6	3,4	8,3	3,0	1,9	4,5	2,6	1,1	4,6	1,2	1,0	1,5	0,9	0,5	1,4
0,30	6,9	4,4	10,1	3,9	2,5	5,7	3,6	1,7	6,2	1,4	1,2	1,7	1,2	0,7	1,7
0,35	8,5	5,5	12,2	5,0	3,3	7,1	4,8	2,4	8,1	1,7	1,4	1,9	1,5	0,9	2,1
0,40	10,2	6,8	14,7	6,3	4,3	8,8	6,4	3,5	10,7	1,9	1,6	2,2	1,8	1,1	2,6
0,45	12,2	8,3	17,7	7,9	5,5	11,0	8,5	4,8	14,2	2,1	1,8	2,5	2,2	1,5	3,2
0,50	14,6	10,0	21,4	9,8	6,9	13,7	11,1	6,5	18,9	2,4	2,1	2,8	2,8	1,9	3,9
0,55	17,4	12,0	26,0	12,1	8,7	17,2	14,6	8,7	25,5	2,7	2,4	3,2	3,4	2,3	4,8
0,60	20,8	14,4	31,8	15,1	10,8	21,7	19,2	11,5	35,1	3,1	2,7	3,6	4,2	3,0	5,9
0,65	25,1	17,2	39,4	19,0	13,5	27,9	25,5	15,2	49,4	3,5	3,0	4,1	5,2	3,7	7,4
0,70	30,5	20,8	49,6	24,1	17,1	36,6	34,4	20,1	71,7	4,0	3,5	4,8	6,6	4,7	9,6
0,75	37,7	25,3	63,9	31,3	21,7	49,2	47,5	27,0	108,5	4,7	4,0	5,6	8,4	6,0	12,7
0,80	47,7	31,3	85,2	41,7	28,3	69,0	68,1	36,9	173,8	5,5	4,6	6,7	11,1	7,7	17,7
0,85	62,8	39,9	119,7	58,4	38,3	102,8	103,7	52,8	304,2	6,6	5,5	8,4	15,3	10,4	26,1
0,90	88,7	53,8	184,8	89,2	55,7	170,9	175,9	82,0	621,3	8,4	6,9	11,0	22,9	14,8	43,1
0,91	96,4	57,8	205,4	98,8	60,9	193,4	199,9	91,0	739,3	8,9	7,2	11,7	25,3	16,1	48,7
0,92	105,6	62,5	230,5	110,4	67,1	221,3	229,6	102,0	893,3	9,5	7,7	12,6	28,1	17,7	55,7
0,93	116,7	68,0	261,6	124,7	74,6	256,7	267,5	115,5	1100,6	10,2	8,1	13,7	31,6	19,5	64,6
0,94	130,4	74,8	301,6	142,9	83,9	303,1	317,1	132,6	1390,1	11,0	8,7	14,9	36,0	21,8	76,2
0,95	148,1	83,3	354,7	167,0	96,0	366,5	385,1	155,1	1815,4	12,0	9,4	16,5	41,8	24,7	92,1
0,96	171,9	94,4	429,5	200,4	112,3	458,4	483,8	186,4	2486,1	13,3	10,3	18,6	49,7	28,7	115,1
0,97	206,5	110,1	543,8	250,9	136,1	603,9	640,5	233,5	3662,5	15,2	11,6	21,6	61,7	34,3	151,6
0,98	263,5	134,9	744,8	338,2	175,6	872,1	930,1	314,5	6137,9	17,9	13,4	26,3	82,0	43,5	219,0
0,99	387,1	185,6	1225,0	541,3	262,0	1559,0	1674,2	501,6	13883,0	23,4	17,0	35,9	128,6	63,2	391,7

Alle ITC zeigten im sterilen Sand gegenüber den Mikrosklerotien eine Wirkung. Auf der Grundlage der Dosis-Wirkungsbeziehungen bzw. LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werte können die aromatischen ITC im Vergleich zu den aliphatischen ITC als toxischer eingestuft werden (Tab. 20). Für methyl- und propenyl-ITC wurden jeweils LD<sub>90</sub>-Werte von ca. 90,0 nmol/g Sand bestimmt. Im Vergleich dazu erwies sich 4-methylsulfinyl-3-butenyl ITC als weniger toxisch. Mit LD<sub>90</sub>-Werten von 8,4 bzw. 22,9 nmol/g Sand zeigten benzyl- und phenyl-ITC die höchste Toxizität.

Tab. 20: Toxizität der Isothiocyanate gegenüber Mikrosklerotien in sterilem Sand

Isothiocyanate	LD <sub>50</sub> <sup>1</sup>	LD <sub>90</sub> <sup>1</sup>
	(nmol/g Sand)	
<i>aliphatische ITC</i>		
methyl-	9.8 (6.9-13.7)	89.2 (55.7-170.9)
2-propenyl-	14.6 (10.0-21.4)	88.7 (53.8-184.8)
4-methylsulfinyl-3-butenyl-	11,1 (6.5-18.9)	175.9 (82.0-621.3)
<i>aromatische ITC</i>		
benzyl-	2.4 (2.1-2.8)	8.4 (6.9-11.0)
phenylethyl-	2.8 (1.9-3.9)	22.9 (14.8-43.1)

<sup>1</sup> Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall in Klammern

### 3.2 Toxizität von 2-propenyl-ITC in natürlichen Böden

Im Vergleich zum sterilen Quarzsand war die Toxizität von 2-propenyl-ITC in natürlich verseuchten Böden deutlich verringert. Die Applikation von 2-propenyl-ITC mit einer Dosis von 150,0 nmol/g Sand eliminierte im Quarzsand alle Mikrosklerotien (Boden 23). Dagegen wurden in den natürlichen Böden 1-22 mit der gleichen Behandlung sehr unterschiedliche Wirkungsgrade zwischen 9,1 (Boden 19) und 91,9 % (Boden 2) erzielt (Tab. 21, Abb. 12).

Die Wirkung von 2-propenyl-ITC war negativ korreliert mit dem organischen Kohlstoffgehalt der Böden (Abb. 13). Es wurde eine mittlere lineare, signifikante Korrelation ermittelt ( $R^2=0.409$ ,  $P=0.001$ ). Korrelationen des pH-Wertes ( $R^2=0.066$ ,  $P=0.236$ ) oder der Bodenzusammensetzung ( $R^2=0.101$ ,  $P=0.139$ ) mit der Mortalität der Mikrosklerotien waren dagegen nicht signifikant.

Tab. 21: Wirkung von 2-propenyl-ITC (150,0 nmol/g Boden) auf Mikrosklerotien in unterschiedlich natürlich verseuchten Böden (n=3)

Boden (Nr.)	Probenbezeichnung	unbehandelt <sup>1</sup> (MS/g Boden)	behandelt mit 2-propenyl-ITC <sup>1</sup> (MS/g Boden)	Wirkungsgrad (%)
1	406-2	10,2 ± 1,5	3,2 ± 0,3	68,9
2	404-3	45,0 ± 5,3	3,7 ± 0,6	91,9
3	403-1	22,7 ± 4,2	5,5 ± 0,5	75,7
4	401-1	49,5 ± 2,3	41,7 ± 1,5	15,8
5	396-1	26,8 ± 3,3	10,5 ± 0,9	60,9
6	395-1	89,8 ± 5,6	44,3 ± 3,4	50,7
7	393-4	14,2 ± 1,3	10,2 ± 0,6	28,2
8	386-2	20,2 ± 4,2	5,7 ± 2,8	71,9
9	373-2	42,0 ± 2,2	26,2 ± 3,0	37,7
10	371-6	22,0 ± 2,3	18,7 ± 3,3	15,2
11	365-1	7,0 ± 2,3	2,3 ± 0,7	66,7
12	364-6	33,7 ± 1,0	19,2 ± 3,8	43,1
13	363-1	40,1 ± 5,8	34,3 ± 1,6	14,5
14	360-2	49,0 ± 6,9	14,3 ± 3,1	70,8
15	357-2	8,0 ± 1,8	6,2 ± 0,8	22,9
16	354-3	8,3 ± 1,8	5,0 ± 0,9	40,0
17	351-1	10,0 ± 2,2	5,8 ± 1,5	41,7
18	348-1	5,3 ± 1,9	2,3 ± 1,4	56,3
19	346-12	135,7 ± 6,7	123,3 ± 8,8	9,1
20	417-23/24	28,0 ± 1,8	16,8 ± 2,4	39,9
21	B4	37,7 ± 7,8	10,8 ± 5,9	71,2
22	418-2/3	128,7 ± 7,2	94,2 ± 3,8	26,8
23	MS-Quarzsand	101,7 ± 35,4	0,0 ± 0,0	100,0

<sup>1</sup> Mittelwerte mit Standardabweichung

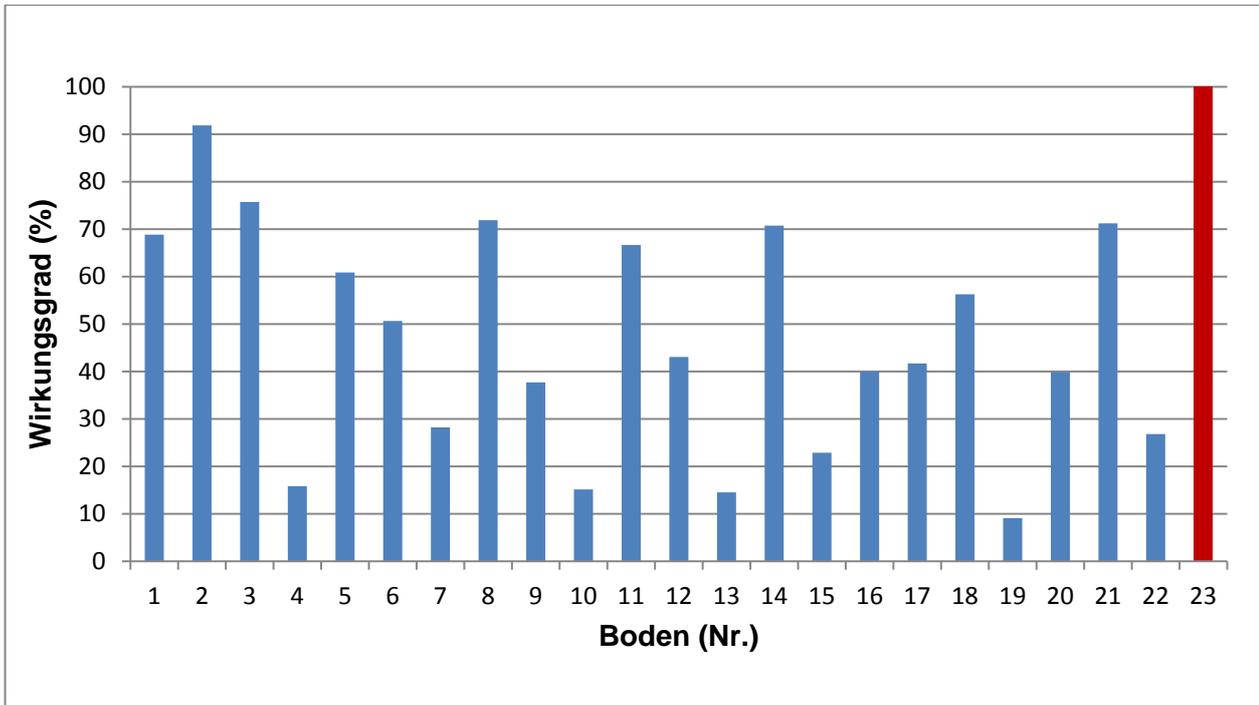


Abb. 12: Wirkungsgrad der 2-propenyl-Behandlung (150,0 nmol/g Boden) in unterschiedlich natürlich verseuchten Böden (Boden 23 = Kontrolle: steriler Quarzsand)

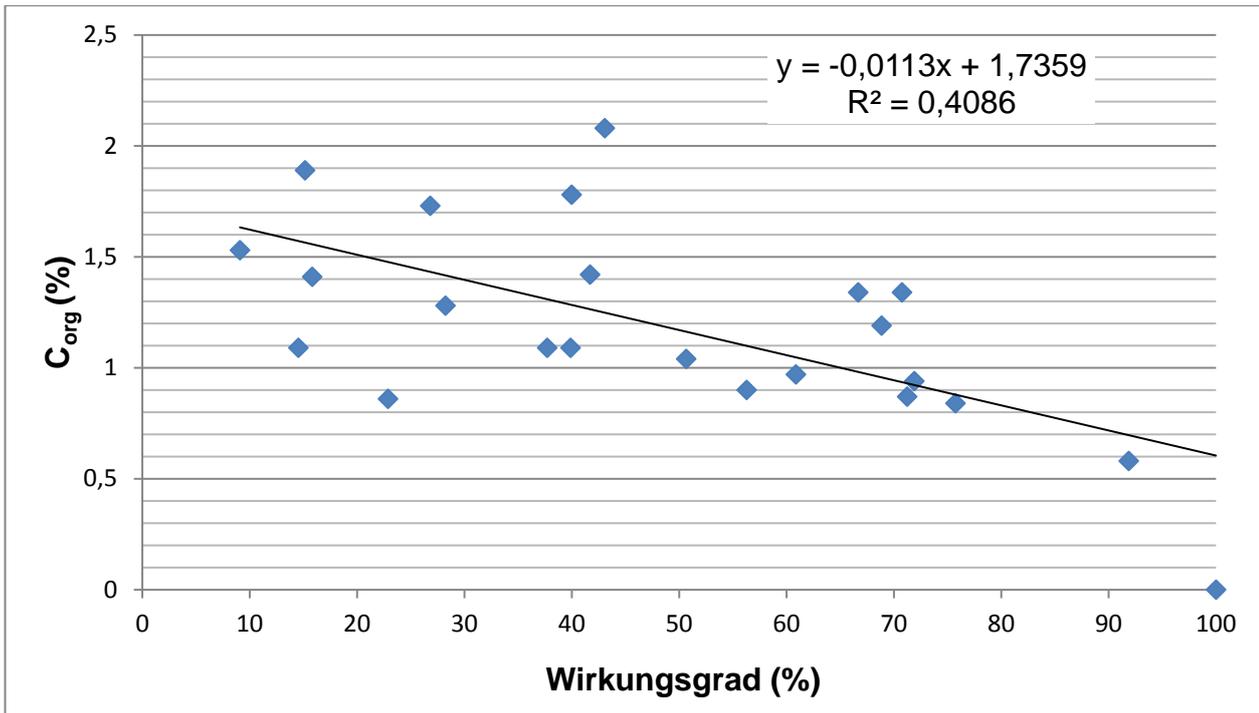


Abb. 13: Korrelation zwischen Wirkung der 2-propenyl-Behandlung und C<sub>org</sub>-Gehalt der Böden

### 3.3 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Grünmassen im Labor

#### 3.3.1 Glucosinolat-Profile der Grünmassen

Im Anbaujahr 2010 herrschten unmittelbar nach der Aussaat sehr hohe Temperaturen von bis zu 36°C. Dies führte in der Folge insbesondere bei *B. juncea* und *S. alba* zu einem sehr lückigen Auflauf und ungleichmäßigen Beständen. Insgesamt müssen die Anbaubedingungen im Vergleich zu 2011 und 2012 als suboptimal bewertet werden.

In den Grünmassen von *B. juncea*, *B. nigra* und *B. carinata* wurde erwartungsgemäß Sinigrin als einzige GSL-Hauptkomponente nachgewiesen. Die *B. juncea*-Sorten von Petersen wiesen über alle Anbaujahre Sinigrin-Gehalte von ca. 15,0-25,0 µmol/g TM auf. Die Sorte 'Energy' zeigte 2011 und 2012 jeweils die höchsten Gehalte. Sie konnte im Boden potentielle Mengen von 2-propenyl-ITC von 89,4 bzw. 170,8 nmol/g freisetzen (Tab. 22-24). Noch besser schnitt 2012 die Sorte 'J1' ab mit einem Sinigrin-Höchstgehalt von 34,4 µmol/g TM und einer potentiell freisetzbaren ITC-Menge von 273 nmol/g Boden.

Die 2012 zusätzlich geprüften Sorten von *B. nigra* und *B. carinata* wiesen im Vergleich deutlich geringere Sinigrin-Konzentrationen auf (Tab. 24). Die *B. carinata*-Sorten fielen durch sehr hohe Trockenmasseerträge auf. Die Sorte 'Cappuccino' konnte mit 141,0 nmol/g Boden die potentiell höchste ITC-Menge freisetzen.

Tab. 22: Analyse Grünmasse von *B. juncea* - Anbau 2010

Sorte	Biomasseertrag			Sinigrin	
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konzentration in TM (µmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Terrafit	3,2	0,3	19,1 ± 1,8	5,1	37,9
Energy	3,6	0,3	19,6 ± 0,1	6,4	47,1
BRJ-101	4,0	0,4	18,7 ± 2,2	7,3	53,7
BRJ-102	3,1	0,4	16,7 ± 0,6	5,9	44,0
BRJ-103	3,9	0,4	15,3 ± 1,4	5,8	43,0

<sup>1</sup>max. 2-propenyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 23: Analyse Grünmasse von *B. juncea* - Anbau 2011

Sorte	Biomasseertrag			Sinigrin	
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konzentration in TM (µmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Terrafit	2,9	0,5	20,1 ± 2,9	10,6	78,2
Energy	2,8	0,5	26,5 ± 2,2	12,1	89,4
BRJ-101	3,6	0,5	21,9 ± 1,6	11,9	87,8
BRJ-102	3,2	0,5	15,5 ± 1,9	7,5	55,8
BRJ-103	1,9	0,4	24,4 ± 4,7	9,2	67,8

<sup>1</sup>max. 2-propenyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 24: Analyse Grünmasse von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* - Anbau 2012

Sorte	Biomasseertrag			Sinigrin	
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konzentration in TM (µmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Terrafit	4,5	0,8	22,8 ± 3,4	17,2	127,1
Energy	4,9	0,9	25,6 ± 6,0	23,2	170,8
BRJ-101	5,3	0,9	16,1 ± 1,5	13,8	102,0
BRJ-102	5,5	0,7	16,1 ± 3,9	11,5	85,5
BRJ-103	5,0	0,8	21,1 ± 2,7	17,2	127,2
J1	6,1	1,1	34,4 ± 1,7	36,8	273,0
M24	5,5	0,9	17,9 ± 4,8	15,6	115,8
Utopia	7,6	1,3	10,6 ± 4,7	13,5	100,1
Carbon	8,5	1,1	12,5 ± 1,2	13,2	98,0
Cappuccino	7,0	1,0	18,5 ± 2,2	19,0	141,0

<sup>1</sup>max. 2-propenyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

In den Grünmassen von *R. sativus* konnte lediglich das GSL Raphsatin nachgewiesen werden. Die Sorten `Defender` und `Consul` wiesen sowohl 2010 als auch 2011 deutlich höherer Gehalte auf als die Sorten `Colonel` und `Picobello` (Tab. 25 u. 26). Ähnlich hohe Werte konnten 2011 auch für die Genotypen `Adagio` und `Commodore` ermittelt werden. Bei 100%iger Umsetzung im Boden konnten die aussichtsreichsten Genotypen über ihre Grünmassen 4-methylthiobutenyl-ITC in maximaler Höhe von 98,2-142,0 nmol/g Boden freisetzen.

Tab. 25: Analyse Grünmasse von *R. sativus* - Anbau 2010

Sorte	Biomasseertrag		Raphsatin		
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konzentration in TM (µmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Defender	10,1	1,1	8,6 ± 1,1	9,1	67,4
Consul	8,5	0,7	11,9 ± 1,6	8,3	61,5
Colonel	9,5	0,9	4,5 ± 1,6	4,1	30,1
Picobello	9,4	1,0	4,3 ± 1,6	4,2	30,8

<sup>1</sup>max. 4-methylthiobutenyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 26: Analyse Grünmasse von *R. sativus* - Anbau 2011

Sorte	Biomasseertrag		Raphsatin		
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konzentration in TM (µmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Defender	7,3	0,9	17,1 ± 4,1	14,9	111,0
Contra	5,6	0,7	14,0 ± 4,1	9,8	72,8
Adagio	8,3	1,0	19,6 ± 0,3	19,2	142,0
Consul	4,4	0,5	15,3 ± 4,1	8,1	59,8
Siletta Nova	6,1	0,8	4,0 ± 3,0	3,1	22,8
Colonel	5,6	0,8	7,7 ± 1,1	6,0	44,6
Picobello	4,4	0,5	9,4 ± 0,5	4,7	34,8
Commodore	6,3	0,7	18,2 ± 2,4	13,3	98,2

<sup>1</sup>max. 4-methylthio-3-butenyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Die Sorten von *S. alba* wiesen als GSL-Hauptkomponente Sinalbin auf mit Gehalten zwischen 10,0 und 19,8  $\mu\text{mol/g}$  TM (Tab. 27 u. 28). Aufgrund der sehr geringen Stabilität der 4-Hydroxybenzyl-ITC können die freisetzbaren Mengen für die Biofumigationswirkung als wenig relevant angesehen werden. Als zweites GSL wurde in allen Geweben Tropaeolin in niedrigen Konzentrationen von 0,9-3,3  $\mu\text{mol/g}$  TM nachgewiesen. Die Sorte 'Accent' wies in beiden Anbaujahren die höchsten Gehalte auf. Die freisetzbaren Mengen von Benzyl-ITC bewegten sich - vor allem auch beeinflusst in Abhängigkeit durch variable Trockenmassenerträge - zwischen 3,2 und 19,1 nmol/g Boden.

Tab. 27: Analyse Grünmasse von *S. alba* - Anbau 2010

Sorte	Biomasseertrag		Sinalbin			Tropaeolin		
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konz. in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konz. <sup>1</sup> im Boden (nmol/g)	Konz. in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konz. <sup>2</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Cover	4,9	0,5	11,9 ± 1,0	5,8	42,9	2,5 ± 0,4	1,2	9,0
Absolut	5,4	0,8	11,8 ± 1,8	9,3	68,6	2,4 ± 0,5	1,9	14,1
Accent	5,5	0,8	10,0 ± 0,7	7,8	57,7	3,3 ± 0,5	2,6	19,1

<sup>1</sup> max. 4-Hydroxybenzyl- und <sup>2</sup> Benzyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 28: Analyse Grünmasse von *S. alba* - Anbau 2011

Sorte	Biomasseertrag		Sinalbin			Tropaeolin		
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konz. in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konz. <sup>1</sup> im Boden (nmol/g)	Konz. in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	Konz. <sup>2</sup> im Boden (nmol/g Boden)
Luna	2,0	0,3	16,0 ± 1,4	5,3	39,4	2,4 ± 0,6	0,8	5,9
Cover	2,6	0,5	19,8 ± 3,5	9,2	68,0	0,9 ± 0,2	0,4	3,2
Absolut	2,8	0,5	16,0 ± 1,7	8,1	59,6	2,0 ± 0,2	1,0	7,4
Maxi	2,3	0,4	11,4 ± 2,3	4,9	36,2	1,8 ± 0,2	0,8	5,7
Accent	2,7	0,5	11,1 ± 1,5	5,2	38,6	2,6 ± 0,7	1,2	8,9
Samba	1,7	0,3	12,9 ± 0,7	4,1	30,1	2,4 ± 0,7	0,8	5,6

<sup>1</sup> max. 4-Hydroxybenzyl- und <sup>2</sup> Benzyl-Konzentration (bei 100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Im Gewebe der beiden Genotypen von *E. sativa* wurden die GSL Erucin und Raphanin nachgewiesen. Die Erucin-Gehalte lagen hierbei etwas höher (Tab. 29). Bei geringen Trockenmassenerträgen von 0,3 kg/m<sup>2</sup> konnte für beide Sorten eine potentiell freisetzbare Gesamt-ITC-Menge von ca. 30,0 nmol/g Boden errechnet werden.

Tab. 29: Analyse Grünmasse von *E. sativa* - Anbau 2011

Sorte	Biomasseertrag		Erucin			Raphanin		
	FM (kg/m <sup>2</sup> )	TM (kg/m <sup>2</sup> )	Konz. in TM (μmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konz. <sup>1</sup> im Boden (nmol/g)	Konz. in TM (μmol/g)	Ertrag (mmol/m <sup>2</sup> )	ITC Konz. <sup>2</sup> im Boden (nmol/g)
ERS-1001	2,0	0,3	8,5 ± 1,4	2,5	18,5	6,6 ± 0,5	1,9	14,4
ERS-1002	2,0	0,3	11,8 ± 0,3	3,4	25,1	3,8 ± 0,6	1,1	8,2

<sup>1</sup>max. 4-methylthiobutyl- und <sup>2</sup>4-methylsulfinylbutyl-Konzentration (100% Umsetzung) bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

### 3.3.2 Theoretisches Biofumigationspotential der Grünmassen

Die auf der Grundlage der ermittelten GSL-Gehalte und der Biomassen berechneten, maximal erzielbaren ITC-Konzentrationen im Boden (siehe Tabellen 22-29) können mit den toxikologischen Kennwerten der ITC verglichen werden, um daraus die theoretische Biofumigationsleistung der Grünmasse eines Genotyps abzuleiten. Als Vergleichsparameter wurden die ED<sub>50</sub>- und ED<sub>90</sub>-Werte (Tab. 20) der jeweiligen ITC verwendet, d.h. 2-propenyl-ITC für alle Sinigrin-haltigen *Brassica* sp. und benzyl-ITC für *S. alba*. Im Falle von *R. sativus* und *E. sativa* wurde 4-methylsulfinyl-3-butenyl-ITC zur Bewertung herangezogen, da sie der vom Gewebe freigesetzten ITC chemisch ähnlich ist. Das theoretische Biofumigationspotential wurde als „gering“ oder „mittel“ eingestuft, wenn die potentiell freisetzbare ITC-Menge unterhalb bzw. oberhalb des ED<sub>50</sub>-Wertes der jeweiligen ITC lag. Bei maximal freisetzbaren ITC-Mengen oberhalb des ED<sub>90</sub>-Wertes erfolgte eine Bewertung mit „hoch“.

Das theoretische Biofumigationspotential der untersuchten Grünmassen konnte am häufigsten mit „mittel“ bewertet werden (Tab. 30). Die Sinigrin-haltigen Gewebe verschiedener *Brassica* sp. wiesen insbesondere für das Anbaujahr 2012 eine hohe potentielle Wirkung auf. Dies konnte auch vereinzelt für einige Sorten von *S. alba* festgestellt werden.

Tab. 30: Theoretisches Biofumigationspotential der Grünmassen auf der Grundlage der ermittelten GSL-Profile und Biomasseerträge sowie der Toxikologie der relevanten ITC

<b>Gattung/Art</b>	<b>Sorte</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
<i>Sinapis alba</i>	Luna	n.e.	2	n.e.
	Cover	3	2	n.e.
	Absolut	3	2	n.e.
	Maxi	n.e.	2	n.e.
	Mikado	n.e.	2	n.e.
	Accent	3	3	n.e.
	Samba	n.e.	2	n.e.
<i>Brassica juncea</i>	TerraFit	2	2	3
	Energy	2	3	3
	BRJ-101	2	2	3
	BRJ-102	2	2	2
	BRJ-103	2	2	3
	J1	n.e.	n.e.	3
<i>Brassica nigra</i>	M24	n.e.	n.e.	3
<i>Brassica carinata</i>	Utopia	n.e.	n.e.	3
	Carbon	n.e.	n.e.	3
	Cappuccino	n.e.	n.e.	3
<i>Raphanus sativus</i>	Defender	2	2	n.e.
	Contra	n.e.	2	n.e.
	Adagio	n.e.	2	n.e.
	Consul	2	2	n.e.
	Siletta Nova	n.e.	2	n.e.
	Colonel	2	2	n.e.
	Picobello	2	2	n.e.
	Commodore	n.e.	2	n.e.
<i>Eruca sativa</i>	ERS-1001	n.e.	2	n.e.
	ERS-1002	n.e.	2	n.e.

n.e. = nicht ermittelt; Biofumigationspotential: 1 = gering, 2 = mittel, 3 = hoch

### 3.3.3 Wirkung der Grünmassen im Biotest in Quarzsand

#### Vorversuch

Im Rahmen der Entwicklung des Biotestes wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. In einem Versuchsansatz galt es die Frage nach der geeigneten 'Kontrolle' zu klären. Hierbei war zu berücksichtigen, dass eine zugeführte Biomasse über ihre Biofumigationswirkung hinaus eine positive oder negative Wirkung auf das Keimverhalten der Mikrosklerotien ausüben kann. Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung gefriergetrockneter Grünmassen der GSL-haltigen Genotypen *B. juncea* 'Energy' und *S. alba* 'Accent' im Vergleich zu vorher autoklavierten Grünmassen geprüft. Hierbei zeigte *B. juncea* eine mit 64,0 % zu erwartende Wirkung, während *S. alba* wirkungslos war (Tab. 31). Die jeweils autoklavierten Biomassen wiesen signifikante Wirkungen auf, was auf ein nicht vollständig deaktiviertes GSL-Myrosinase-System oder andere Effekte hinweist. Die Einmischung einer GSL-freien Grünmasse von *Phacelia* hatte im Vergleich zur Biomasse-freien Variante dagegen keinen signifikanten Einfluss. Deshalb wurde für das Screening der Genotypen (siehe unten) die Applikation von *Phacelia*-Grünmasse als weitere Kontrolle gewählt.

Tab. 31: Wirkung der Grünmassen von *B. juncea* 'Energy' und *S. alba* 'Accent' im Biotest im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen (n=4)

Variante	Mikrosklerotien (Anzahl/g Sand) <sup>1</sup>		Wirkungsgrad (%)
ohne Biomasse	137,9 ± 4,6	a	-
<i>P. tanacetifolia</i>	133,9 ± 12,1	a	2,9
<i>B. juncea</i> 'Energy'	49,7 ± 6,8	c	64,0
<i>B. juncea</i> 'Energy' autoklaviert	84,7 ± 7,2	b	38,6
<i>S. alba</i> 'Accent'	138,1 ± 4,6	a	0,0
<i>S. alba</i> 'Accent' autoklaviert	90,3 ± 1,4	b	34,5

<sup>1</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (P ≤ 0.05)

#### Screening Grünmassen 2011

Die Applikation der GSL-freien Grünmasse von *Phacelia* schien das Keimverhalten der Mikrosklerotien zu stimulieren und führte zu einem nahezu doppelt so hohen Nachweis im Vergleich zur Biomassen-freien Kontrolle mit lediglich 108,8 MS/g Boden (Tab. 32). Da auch für viele geprüfte Genotypen deutlich höhere Werte ermittelt wurden, diente die *Phacelia*-Kontrolle zur Berechnung der Wirkungsgrade.

Die *B. juncea*-Genotypen zeigten die höchsten Wirkungsgrade von 69,3 bis 81,3 % (Tab. 32, Abb. 14). Eine ähnlich gute Wirkung wiesen die Grünmassen der beiden Genotypen von *E. sativa* auf. Die geprüften Sorten von *S. alba* und *R. sativus* wirkten dagegen signifikant schlechter mit niedrigen Wirkungsgraden zwischen 9,2 bis 37,5 %.

Tab. 32. Wirkung der Grünmassen verschiedener Genotypen aus dem Anbaujahr 2011 im Biotest sowie ihre maximal freisetzbare ITC-Menge (n=4)

Art/Sorte	Biotest		max. freisetzbare ITC-Menge (nmol/g Sand) <sup>c</sup>			
	Mikrosklerotien (Anzahl/g Sand) <sup>a</sup>	Wirkungsgrad (%) <sup>b</sup>	2-propenyl	4-methylthio- 3-butenyl	4-MTB 4-MSB	benzyl
ohne Biomasse	108,8 ± 8,2	b				
<i>P. tanacetifolia</i>	194,0 ± 14,3	f				
<i>Brassica juncea</i>						
Terrafit	59,6 ± 12,5	a	69,3	70,1	-	-
102	52,3 ± 9,1	a	73,0	50,6	-	-
103	46,8 ± 5,8	a	75,9	59,6	-	-
Energy	46,4 ± 3,8	a	76,1	78,1	-	-
101	36,2 ± 8,7	a	81,3	64,5	-	-
<i>Sinapis alba</i>						
Luna	176,1 ± 33,3	ef	9,2	-	-	7,2
Cover	162,8 ± 26,4	def	16,1	-	-	2,8
Absolut	157,3 ± 19,7	cdef	18,9	-	-	6,5
Samba	144,8 ± 21,4	bcde	25,4	-	-	5,3
Accent	142,5 ± 14,7	bcde	26,6	-	-	9,9
Maxi	121,2 ± 14,4	bc	37,5	-	-	5,2
<i>Raphanus sativus</i>						
Defender	147,2 ± 12,8	bcde	24,1	-	83,7	-
Colonel	145,1 ± 18,7	bcde	25,2	-	40,3	-
Consul	139,4 ± 5,3	bcde	28,1	-	47,6	-
Contra	138,0 ± 7,8	bcde	28,9	-	44,6	-
Adagio	135,8 ± 4,9	bcde	30,0	-	86,8	-
Picobello	133,1 ± 8,2	bcd	31,4	-	41,4	-
Siletta Nova	121,8 ± 16,8	bc	37,2	-	14,9	-
Commodore	121,5 ± 13,3	bc	37,4	-	75,0	-
<i>Eruca sativa</i>						
ERS-1001	80,1 ± 14,3	ba	58,7	-	-	32,9
ERS-1002	66,9 ± 5,0	a	65,5	-	-	33,3

<sup>a</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ ), <sup>b</sup> Wirkungsgrad berechnet in Relation zur *Phacelia*-Kontrolle, <sup>c</sup> Berechnung der max. freisetzbaren ITC-Menge auf Grundlage der GSL-Konzentration der applizierten Biomasse (Dichte Sand: 1.59 g cm<sup>-3</sup>)

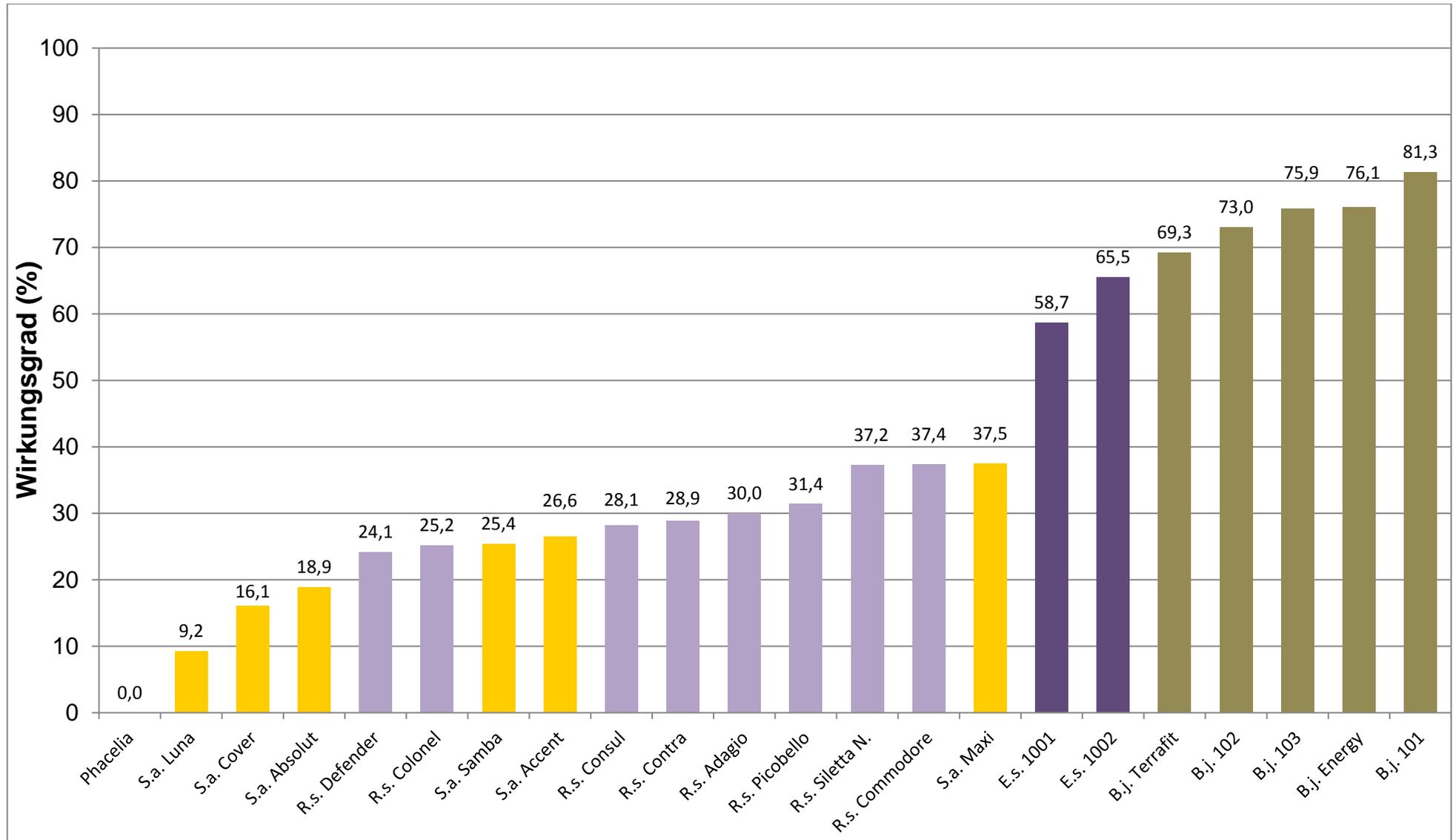


Abb. 14: Wirkungsgrade der Grünmassen verschiedener Genotypen aus Anbau 2011 gegenüber *Verticillium* im Biotest

### 3.3.4 Einfluss der Grünmassen auf die Wirkung freigesetzter Isothiocyanate

In zwei weiteren ergänzenden Versuchen wurde der Einfluss der applizierten Grünmasse von *B. juncea* 'Energy' und *S. alba* 'Accent' auf die Wirkung der jeweils freigesetzten ITC untersucht (Tab. 33). Hier wurde in einer Variante eine pure ITC-Verbindung appliziert und in einer weiteren Vergleichsvariante die gleiche ITC-Menge mit einer autoklavierten Biomasse kombiniert, die diese ITC-Menge generieren könnte, deren GSL-Myrosinase-System aber inaktiviert war.

Die Applikation von 2-propenyl-ITC mit 50,0 nmol/g Sand führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer 100%igen Wirkung. Bei Anwesenheit des *B. juncea*-Gewebes wurde die Wirkung dieser ITC-Menge auf 92,5 % leicht verringert. Auch die applizierte Menge benzyl-ITC von 10,0 nmol/g Sand eliminierte alle Mikrosklerotien. Wurde diese ITC-Menge aber mit Gewebe von *S. alba* kombiniert, war ihre Wirkung deutlich verringert. Der ermittelte Wirkungsgrad betrug lediglich 32,4 %.

Tab. 33: Wirkung von 2-propenyl-ITC (50 nmol/g Sand) und benzyl-ITC (10 nmol/g Sand) mit und ohne jeweiliger Biomasse (n=4)

Variante	Mikrosklerotien <sup>1</sup> (Anzahl/g Sand)		Wirkungsgrad (%)
<i>2-propenyl ITC</i>			
ohne Biomasse	107,0 ± 6,0	a	-
2-propenyl ITC + autoklavierte Biomasse <i>B. juncea</i>	8,0 ± 3,6	b	92,5
2-propenyl ITC	0,0 ± 0,0	c	100,0
<i>benzyl ITC</i>			
ohne Biomasse	151,4 ± 4,0	a	-
benzyl ITC + autoklavierte Biomasse <i>S. alba</i>	102,3 ± 31,1	b	32,4
benzyl ITC	0,0 ± 0,0	c	100,0

<sup>1</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (P ≤ 0.05)

### 3.3.5 Wirkung der Grünmasse von *B. juncea* in natürlichen Böden

Die im Screening (siehe Tab. 32) ein hohes Biofumigationspotential zeigende Grünmasse der Sorte 'Energy' von *B. juncea* wurde in sechs natürlich verseuchten Böden unterschiedlicher Standorte geprüft und mit der Applikation einer GSL-freien *Phacelia*-Grünmasse verglichen. Die ermittelten Wirkungsgrade variierten auf einem niedrigen bis mittlerem Niveau zwischen 10,0 und 66,0 % (Tab. 34,

Abb. 15). Eine Reduktion der Mikrosklerotien durch die *B. juncea*-Grünmasse erwies sich in 4 Böden als hoch signifikant. In den Böden 2 und 4 konnte keine signifikante Wirkung ermittelt werden.

Tab. 34: Wirkung der Grünmasse von *B. juncea* 'Energy' in natürlich verseuchten Böden im Vergleich zur Grünmasse *Phacelia* (n=4)

Variante (Boden Nr.)	Mikrosklerotien (Anzahl/g Sand)			Wirkungsgrad (%)
	Kontrolle <i>Phacelia</i>	<i>B. juncea</i> 'Energy'	Sig.(p =)	
1	20,9 ± 1,1	13,5 ± 1,2	0,000	35,4
2	89,0 ± 5,2	80,1 ± 8,1	0,113	10,0
3	50,9 ± 3,5	17,3 ± 6,7	0,000	66,0
4	24,6 ± 2,1	18,2 ± 4,3	0,050	26,0
5	47,2 ± 3,6	25,0 ± 6,1	0,001	46,0
6	51,9 ± 5,5	19,3 ± 3,3	0,000	62,8

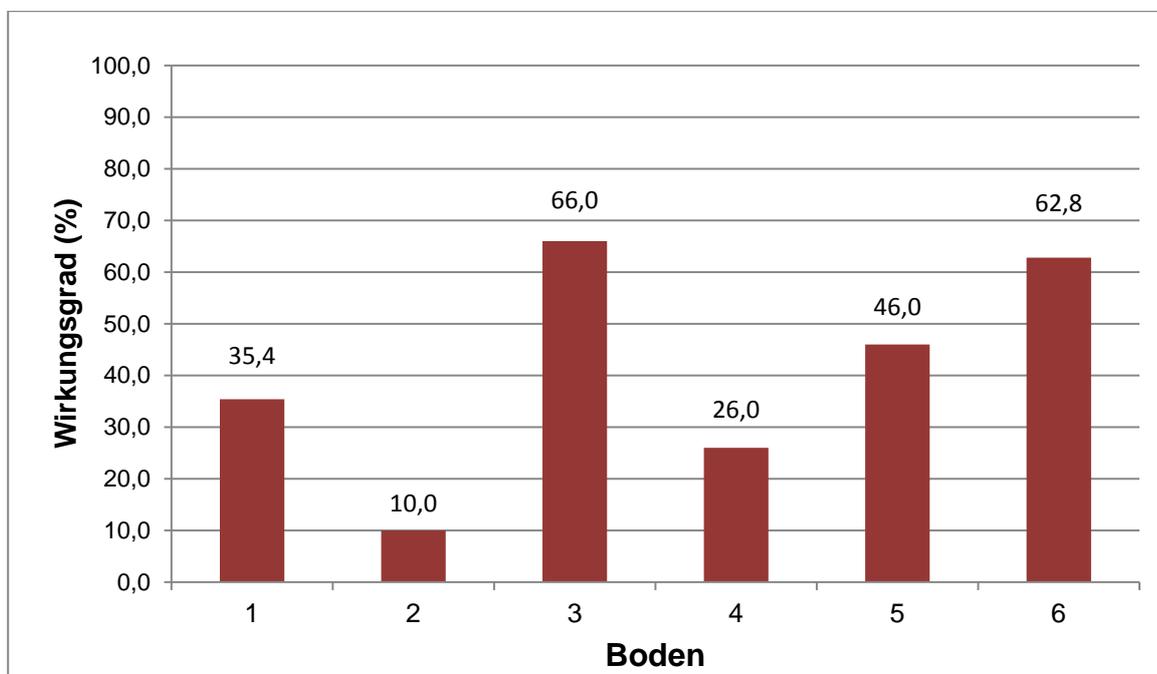


Abb. 15: Wirkungsgrade der Grünmasse von *B. juncea* 'Energy' in unterschiedlichen Böden

### 3.4 Evaluierung des Biofumigationspotentials von Samenmehlen im Labor

#### 3.4.1 Glucosinolat-Profile der Samenmehle

Die Samenmehle der verschiedenen Sorten von *B. juncea* und *B. carinata* aus dem Jahr 2011 (Anbau 2010) wiesen Sinigrin-Gehalte zwischen 82,8 und 108,1  $\mu\text{mol/g}$  auf (Tab. 35). Bei einer Ausbringungsmenge von 250  $\text{g/m}^2$  und einer Einarbeitungstiefe von 10 cm würden sie somit maximal 142,6-186,2 nmol 2-propenyl-ITC/g Boden freisetzen können. Die aus eigenem Anbau 2012 gewonnenen Samenmehle der gleichen Sorten wiesen ähnliche Gehalte an Sinigrin auf (Tab. 36). Im Samenmehl der *B. nigra*-Sorte 'M24' aus dem Jahr 2011 konnte in gleichen Teilen Sinigrin und Gluconapin nachgewiesen werden. Dagegen beinhaltet das 2012 gewonnene Mehl dieser Sorte nur Sinigrin.

Tab. 35: Analyse der Samenmehle von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* - Herkunft 2011

Art/Sorte	Sinigrin		Gluconapin	
	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden (nmol/g)	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>2</sup> im Boden (nmol/g)
<i>B. juncea</i>				
Terrafit	99,0	170,5	-	-
Energy	91,4	157,4	-	-
101	108,1	186,2	-	-
102	107,1	184,5	-	-
103	103,8	177,8	-	-
J1	101,5	174,8	-	-
<i>B. carinata</i>				
Utopia	104,6	180,1	-	-
Carbon	82,8	142,6	-	-
Cappuccino	97,6	168,1	-	-
<i>B. nigra</i>				
M24	57,2	98,5	56,7	97,6

<sup>1</sup>max. 2-propenyl- und <sup>2</sup>3-butenyl-Konzentration (100% Umsetzung) bei Aufwandmenge 250  $\text{g/m}^2$  bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35  $\text{g/cm}^3$

Tab. 36: Analyse der Samenmehle von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* - Anbau 2012

Art/Sorte	Sinigrin		Gluconapin	
	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>2</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )
<i>B. juncea</i>				
TerraFit	109,3	188,3	-	-
Energy	108,3	186,5	-	-
101	99,3	171,0	-	-
102	109,4	188,4	-	-
103	97,3	167,6	-	-
J1	110,0	189,4	-	-
<i>B. carinata</i>				
Carbon	66,7	114,9	-	-
Cappuccino	94,8	163,3	-	-
<i>B. nigra</i>				
M24	70,5	121,4	-	-

<sup>1</sup>max. 2-propenyl-Konzentration (100% Umsetzung) bei Aufwandmenge 250 g/m<sup>2</sup> bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Im Samenmehl von *E. sativa* konnten die beiden GSL Erucin und Raphanin in einem ähnlichen Verhältnis zueinander detektiert werden wie in der Grünmasse (Tab. 37). Das Samenmehl kann mit 162,7 nmol/g Boden eine fast gleichhohe aliphatische ITC-Menge freisetzen wie Samenmehle von *B. juncea*.

Die Samenmehle der verschiedenen Sorten von *S. alba* wiesen hohe Gehalte von Sinalbin auf. Sie könnten Konzentrationen des sehr instabilen 4-hydroxybenzyl-ITC von ca. 200 nmol/g Boden generieren (Tab. 38). Tropaeolin konnte im Gegensatz zur Grünmasse in den Samen nicht detektiert werden. In den Samenmehlen der Sorten von *R. sativus* wurden nur geringe Mengen an Raphsatin nachgewiesen, die niedrige 4-methylthiobutenyl-Konzentrationen im Boden freisetzen können.

In den *B. napus* Samenmehlen wurden die ITC freisetzenden GSL Gluconapin, Glucobrassicinapin und Gluconasturtiin in unterschiedlichen Gehalten nachgewiesen (Tab. 39). Die Samen der Sorte 'Greenland' wiesen dabei den höchsten GSL-Gehalt bzw. maximal freisetzbare ITC-Menge auf. Die Sorte 'Molino' zeichnete sich durch einen sehr niedrigen GSL-Gehalt aus.

Tab. 37: Analyse der Samenmehle von *E. sativa* - Herkunft 2011

Art/Sorte	Erucin		Raphanin	
	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>2</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )
<i>E. sativa</i>				
ERS-1003	88,5	152,4	6,0	10,3

<sup>1</sup>max. 4-methylthiobutyl- und <sup>2</sup>4-methylsulfinylbutyl-Konzentration (100% Umsetzung) bei Aufwandmenge von 250g/m<sup>2</sup> bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 38: Analyse der Samenmehle von *S. alba* und *R. sativus* - Herkunft 2011

Art/Sorte	Sinalbin		Raphsatin	
	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>2</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )
<i>S. alba</i>				
Absolut	116,7	201,0	-	-
Accent	116,6	200,8	-	-
Maxi	133,4	229,7	-	-
Samba	119,6	205,0	-	-
<i>R. sativus</i>				
Defender	-	-	1,8	3,1
Commodore	-	-	1,7	2,9
Picobello	-	-	5,0	8,6
Adagio	-	-	2,4	4,1
Siletta N	-	-	4,8	8,3

<sup>1</sup>max. 4-hydroxybenzyl- und <sup>2</sup>4-methylthio-3-butenyl-Konzentration (100% Umsetzung) bei Aufwandmenge 250 g/m<sup>2</sup> bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

Tab. 39: Analyse der Samenmehle von *B. napus* - Herkunft 2011

Art/Sorte	Gluconapin		Glucobrassicinapin		Gluconasturtiin	
	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>1</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>2</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )	GSL Konzentration in TM ( $\mu\text{mol/g}$ )	ITC Konzentration <sup>3</sup> im Boden ( $\text{nmol/g}$ )
<i>B. napus</i>						
Emerald	35,4	61,0	3,9	6,7	0,9	1,6
Akela	46,7	80,4	7,5	12,9	1,7	2,9
Greenland	34,4	59,3	23,0	39,6	8,1	13,9
Molino	7,7	13,3	3,5	6,0	0,9	1,6

<sup>1</sup>max. 3-butenyl-, <sup>2</sup>4-pentenyl- und <sup>3</sup>2-phenylethyl-Konzentration (100% Umsetzung) bei Aufwandmenge von 250g/m<sup>2</sup> bezogen auf 10 cm Tiefe, Dichte: 1,35 g/cm<sup>3</sup>

### 3.4.2 Freisetzungsrates von 2-propenyl-ITC bei Sinigrin-haltigen Samenmehlen

Mittels spektralphotometrischer Detektion von 1,3-Benzodithiol-2-thion nach zuvor erfolgter Derivatisierung der ITC mittels 1,2-Benzenedithiol wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Sinigrin-haltigen Samenmehlen die Bildung von 2-propenyl-ITC untersucht (siehe 2.1.4.4). Die Werte wurden in Beziehung zur potentiellen, d.h. maximal freisetzbaren Menge - kalkuliert auf Grundlage des zuvor ermittelten Sinigrin-Gehaltes - gesetzt und somit die Freisetzungsrates berechnet (Tab. 40).

In einer ersten Messreihe konnten für die Samenmehle von *B. juncea* Freisetzungsrates von 62,5 bis 100,0 % ermittelt werden. Das Mehl der Sorte 'Energy' zeigte die höchste Umsetzungsrate, d.h. die gesamte Menge Sinigrin von 91,4  $\mu\text{mol/g}$  Samenmehl (Trockenmasse) wurde unter den optimalen Bedingungen des Versuches innerhalb von 24 h in 2-propenyl-ITC verwandelt. Insbesondere die Sorten '103' und 'J1' sowie die Mehle von *B. carinata* wiesen deutlich geringere Freisetzungsrates auf. Die niedrigeren Freisetzungsrates dieser Mehle konnte in einer zweiten Messreihe bestätigt werden. Die Mehle '103' und 'J1' sowie 'Utopia' und 'Cappuccino' verwandelten nur 66,8 bis 78,1 % ihres Sinigrin-Gehaltes in 2-propenyl-ITC um (Tab. 40).

Tab: 40: Bestimmung der Freisetzung von 2-propenyl-ITC bei Sinigrin-haltigen Samenmehlen von *B. juncea* und *B. carinata* mittels spektralphotometrischer Analyse

Art/Sorte	Messreihe 1			Messreihe 2		
	Max. ITC-Konzentration <sup>1</sup>	Freigesetzte ITC-Konzentration <sup>2</sup>	Freisetzungsrate	Max. ITC-Konzentration <sup>1</sup>	Freigesetzte ITC-Konzentration <sup>2</sup>	Freisetzungsrate
	( $\mu\text{mol/g}$ )	( $\text{nmol/g}$ )	(%)	( $\mu\text{mol/g}$ )	( $\text{nmol/g}$ )	(%)
<i>B. juncea</i>						
Terrafit	99,0	95,6	95,5	-	-	
Energy	91,4	92,2	101,0	-	-	
101	108,1	99,4	91,9	-	-	
102	107,1	94,4	88,2	-	-	
103	103,1	78,2	75,9	103,1	80,5	78,1
J1	101,5	63,4	62,5	101,5	67,8	66,8
<i>B. carinata</i>						
Utopia	104,6	69,7	66,6	104,6	71,2	68,1
Carbon	82,8	73,2	88,5	-	-	
Cappuccino	97,6	69,3	71,1	97,6	75,1	76,9

<sup>1</sup>Potentiell (maximal) freisetzbare ITC-Menge auf Grundlagen des GSL-Gehaltes des Samenmehls

<sup>2</sup>Freigesetzte ITC-Menge, die mittels spektralphotometrischer Analyse ermittelt wurde

### 3.4.3 Wirkung der Samenmehle im Biotest in Quarzsand

Die Samenmehle der verschiedenen Sorten von *B. juncea* erwiesen sich als am wirksamsten. Bei maximal freisetzbaren 2-propenyl-ITC-Mengen zwischen 107,0 und 127,0 nmol/g Sand wurden alle Mikrosklerotien abgetötet und somit Wirkungsgrade von 100,0 % erzielt (Tab 40, Abb. 16). Von den übrigen Sinigrin-haltigen Mehlen zeigte nur noch das Mehl der *B. carinata*-Sorte 'Utopia' eine gleich gute Wirkung. Mehle der Sorten *R. sativus* entfalteten Wirkungsgrade zwischen 67,0 und 87,6 %, wobei sie allerdings nur sehr geringe Mengen von 4-methylthio-3-butenyl-ITC freisetzen konnten (2,0-5,9 nmol/g Sand). Das geprüfte Samenmehl von *E. sativa* schnitt mit einem Wirkungsgrad von 99,8 % so gut ab, wie die *B. juncea*-Mehle. Dagegen erwiesen sich alle Mehle der geprüften Sorten von *S. alba* im Vergleich zur Kontrolle mit autoklaviertem *S. alba*-Mehl als wirkungslos. Auch die Mehle von *B. napus* zeigten keine ('Akela' und 'Greenland') oder nur eine sehr schwache Wirkung ('Emerald' und 'Molino').

Tab. 41: Wirkung der Samenmehle verschiedener Genotypen (Herkünfte 2011) im Biotest bei einer Aufwandmenge von 0,4 Vol.-% sowie ihre maximal freisetzbare ITC-Menge (n=4)

Art/Sorte	Biotest		max. freisetzbare ITC-Menge (nmol/g Sand) <sup>c</sup>				
	Mikrosklerotien (Anzahl/g Sand) <sup>a</sup>	WG (%) <sup>b</sup>	2-propenyl	4-methylthio- 3-butenyl	4-MTB 4-MSB	3-butenyl 4-pentenyl 2-phenylethyl	benzyl
ohne Biomasse	116,8 ± 16,4						
<i>Brassica juncea</i>							
Energy autokl.	121,8 ± 12,3	a					
Terrafit	0,0 ± 0,0	b	100,0	116,0	-	-	-
Energy	0,0 ± 0,0	b	100,0	107,1	-	-	-
101	0,0 ± 0,0	b	100,0	126,7	-	-	-
102	0,0 ± 0,0	b	100,0	125,5	-	-	-
103	0,0 ± 0,0	b	100,0	120,8	-	-	-
J1	0,0 ± 0,0	b	100,0	118,9			
<i>Brassica carinata</i>							
Utopia	0,0 ± 0,0	b	100,0	122,6	-	-	-
Cappuccino	6,7 ± 3,0	c	94,5	114,4	-	-	-
Carbon	9,3 ± 3,3	c	92,4	96,8			
<i>Brassica nigra</i>							
M24	9,6 ± 2,2	c	92,1	114,4			
<i>Sinapis alba</i>							
Maxi autokl.	136,1 ± 13,2	a					
Accent	162,8 ± 22,4	a	0,0	-	-	-	0,0
Samba	157,3 ± 12,5	a	0,0	-	-	-	0,0
Absolut	144,8 ± 9,1	a	0,0	-	-	-	0,0
Maxi	142,5 ± 13,2	a	0,0	-	-	-	0,0
<i>Raphanus sativus</i>							
Defender autokl.	137,9 ± 9,6	a					
Adagio	16,8 ± 3,0	d	87,8	-	2,8	-	-
Siletta N	19,7 ± 5,6	e	85,7	-	5,6	-	-
Picobello	20,8 ± 7,0	e	84,9	-	5,9	-	-
Defender	34,5 ± 5,9	d	75,0	-	2,1	-	-
Commodore	45,5 ± 3,5	c	67,0	-	2,0	-	-
<i>Eruca sativa</i>							
ES-1003	0,3 ± 0,4	f	99,8	-	-	110,7	--
<i>Brassica napus</i>							
Emerald	112,6 ± 10,5	b	18,3	-	-	-	47,1
Akela	139,4 ± 10,7	a	0,0	-	-	-	65,5
Greenland	141,3 ± 11,5	a	0,0	-	-	-	76,8
Molino	115,0 ± 12,7	b	16,6	-	-	-	14,2

<sup>a</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ ) innerhalb der einzelnen Samenmehlgruppen,

<sup>b</sup> Wirkungsgrad berechnet in Relation zur jeweiligen autoklavierten Kontrolle. Bei *E. sativa* und *B. napus* in Relation zu 'Defender' autoklaviert, <sup>c</sup> Berechnung der max. freisetzbaren ITC-Menge auf Grundlage der GSL-Gehalte der applizierten Samenmehlmenge (Dichte Sand: 1,59 g cm<sup>-3</sup>)

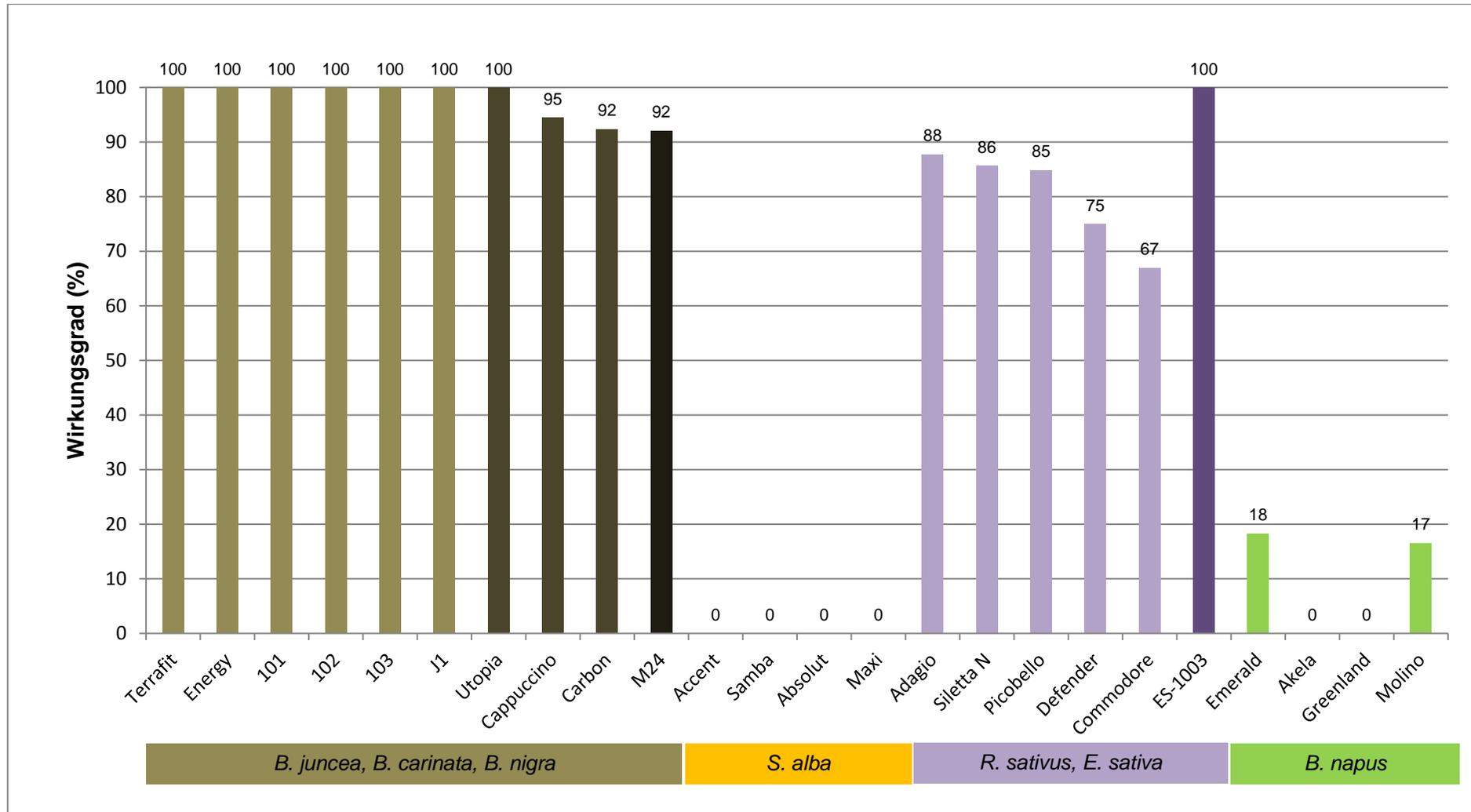


Abb. 16: Wirkungsgrade der Samenmehle verschiedener Genotypen (Herkunft 2011) gegenüber *Verticillium* im Biotest

### 3.4.4 Wirkung des Samenmehls von *B. juncea* in natürlichen Böden

Die Wirkung des *B. juncea*-Samenmehls der Sorte 'Energy' auf Mikrosklerotien des Erregers in verschiedenen natürlichen Böden im Vergleich zu sterilem Quarzsand kann Tabelle 42 entnommen werden. Die Wirkungsgrade bzw. Dosis-Wirkungskurven sind in Abb. 17 dargestellt. Eine Aufwandmenge von 0,2 Vol.-% führte im Sand bereits zu einer vollständigen Eliminierung der Mikrosklerotien. In den natürlichen Böden war die Wirkung dagegen erheblich reduziert. Eine Dosis von 0,2 Vol.-% erbrachte Wirkungsgrade zwischen 14,0 und 52,0 %. Mit der höchsten geprüften Menge von 0,8 Vol.-% konnten in den Böden 1-4 Wirkungsgrade von über 90,0 % erzielt werden. Die errechneten ED<sub>90</sub>-Werte liegen zwischen 0,55 und 0,65 Vol.-% (Tab. 43). In den Böden 5 und 6 war die Wirkung nochmals reduziert, was sich in hohen ED<sub>90</sub>-Werten von 2,21 bzw. 1,27 Vol.-% ausdrückt. Bezogen auf die ED<sub>90</sub>-Werte war die Wirkung des Samenmehls in den Böden in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften im Vergleich zum Quarzsand um ca. das 5-22-fache verringert.

Tab. 42: Wirkung des Samenmehls *B. juncea* 'Energy' in Quarzsand und natürlichen Böden in Abhängigkeit verschiedener Aufwandmengen (n=4)

Konzentration (Vol.-%)	Anzahl Mikrosklerotien/g Boden						
	Quarz- sand	Boden 1	Boden 2	Boden 3	Boden 4	Boden 5	Boden 6
0,05	59,7 ± 4,9						
0,1	14,6 ± 4,0						
0,2	0,1 ± 0,2	4,8 ± 0,9	75,5 ± 2,2	19,2 ± 4,5	12,6 ± 2,5	40,8 ± 5,4	25,6 ± 2,5
0,3	0,0 ± 0,0						
0,3 autokl. <sup>1</sup>	129,9 ± 12,6						
0,4		2,7 ± 0,8	24,5 ± 5,1	11,2 ± 3,0	4,3 ± 2,0	43,3 ± 2,8	17,4 ± 1,7
0,8		0,1 ± 0,2	0,7 ± 0,7	1,8 ± 0,7	0,9 ± 0,8	17,9 ± 4,1	7,5 ± 1,3
0,8 autokl. <sup>1</sup>		9,9 ± 2,0	72,0 ± 4,1	40,1 ± 15,0	23,1 ± 2,6	47,6 ± 3,0	42,9 ± 5,1

<sup>1</sup>Kontrolle, versetzt mit autoklaviertem Samenmehl

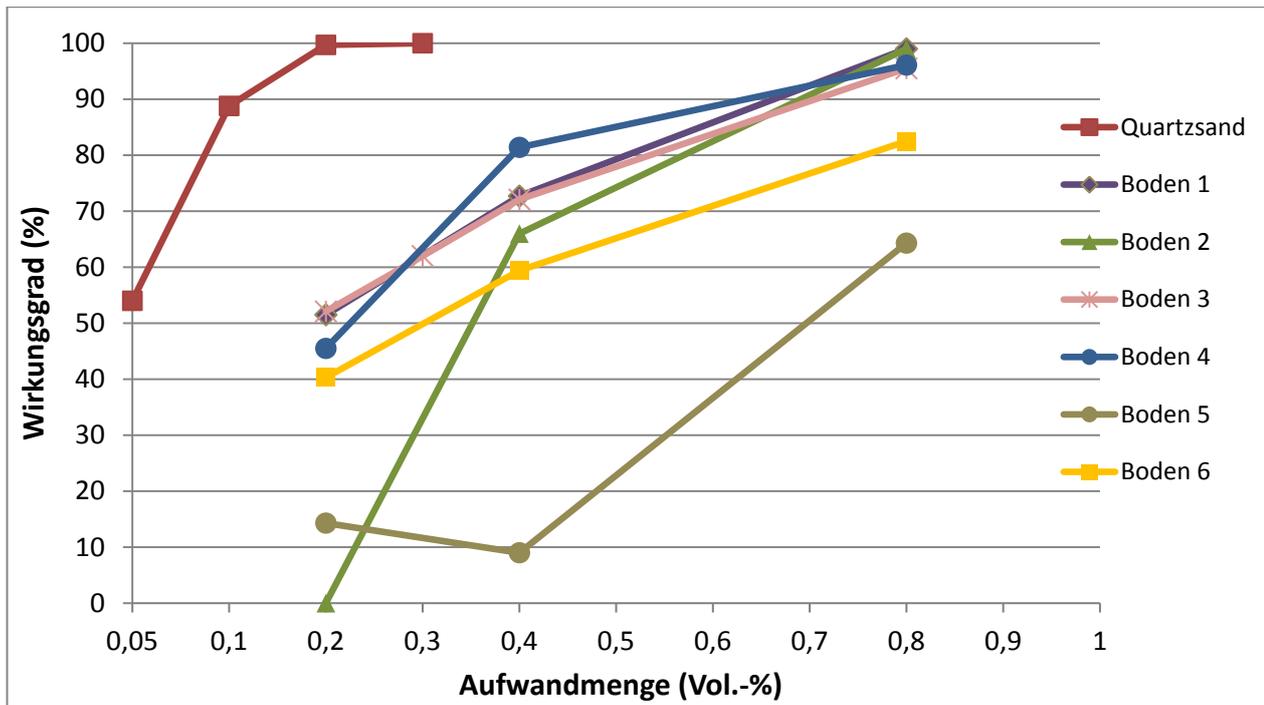


Abb.17: Dosis-Wirkungskurven des Samenmehls *B. juncea* 'Energy' in Quarzsand und natürlichen Böden

Tab. 43: ED<sub>50</sub>- und ED<sub>90</sub>-Werte für Samenmehl *B. juncea* 'Energy'

Böden	ED <sub>50</sub> (Vol.-%)	ED <sub>90</sub> (Vol.-%)
Quarzsand	0,04	0,11
Boden 1	0,21	0,57
Boden 2	0,37	0,51
Boden 3	0,20	0,65
Boden 4	0,22	0,55
Boden 5	0,71	2,21
Boden 6	0,28	1,27

### 3.4.5 ITC-Freisetzung des Samenmehls von *B. juncea* in natürlichen Böden

Unter den Bedingungen des Biotestsystems wurde in drei ausgewählten Böden mittels spektralphotometrischer Analyse (siehe 2.1.4.4.) der zeitliche Verlauf der Freisetzung von 2-propenyl-ITC des *B. juncea*-Samenmehls 'Energy' nach Applikation in einer Höhe von 0,4 Vol.-% erfasst (Abb. 18).

Die höchsten ITC-Konzentrationen wurden im Quarzsand und Boden 1 bereits nach 3 Stunden gemessen mit 63,4 bzw. 62,4 nmol/g Boden. In Boden 5 wurde der höchste Gehalt mit 97,0 nmol/g Boden nach 6 h festgestellt. Anschließend nahm in allen drei Varianten die ITC-Konzentration über den 48stündigen Versuchszeitraum kontinuierlich ab. Bei Versuchsende wurde nur noch Konzentrationen zwischen 8,3 und 24,8 nmol/g Boden gemessen. Der Verlauf der ITC-Freisetzung und -Abnahme war im Quarzsand und Boden 1 nahezu identisch. Dagegen wurden im Boden 5 durchweg ca. doppelt so hohe Mengen an 2-propenyl-ITC nachgewiesen.

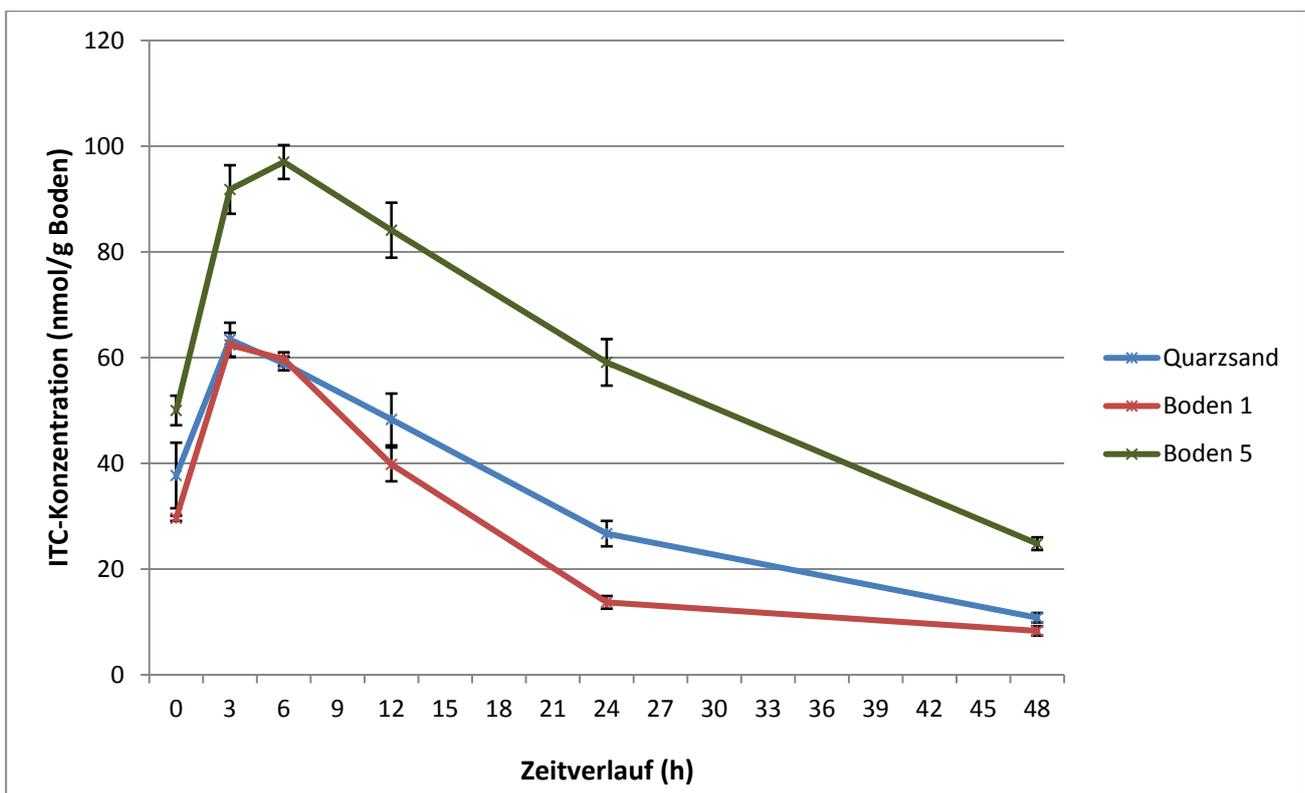


Abb. 18: Verlauf der Freisetzung von 2-propenyl-ITC über 48 h nach Applikation des Samenmehls von *B. juncea* 'Energy' mit 0,4 Vol.-% in unterschiedlichen Böden

### 3.4.6 Wirkung des Samenmehls von *B. juncea* in geschlossenen u. offenen Gefäßen

Das *B. juncea*-Samenmehl der Sorte `101´ zeigte im Boden 1 bei geschlossenen Gefäßen eine 100%ige Wirkung, die in offenen Gefäßen um ca. 50,0 % verringert war (Tab. 44). Im Boden 4 verminderte sich der Wirkungsgrad von 76,4 auf 65,0 %.

Tab. 44: Wirkung des Samenmehls von *B. juncea* `101´ mit einer Aufwandmenge von 0,8 Vol.-% in geschlossenen und offenen Gefäßen

Varianten	Boden 1		Boden 4		
	Mikrosklerotien <sup>1</sup> (Anzahl/g Sand)	Wirkungs- grad (%)	Mikrosklerotien <sup>1</sup> (Anzahl/g Sand)	Wirkungs- grad (%)	
Samenmehl autoklaviert Gefäß geschlossen	8,3 ± 0,2	bc	22,9 ± 2,1	c	
Samenmehl nicht autoklaviert Gefäß geschlossen	0,0 ± 0,0	a	5,4 ± 2,5	a	76,4
Samenmehl autoklaviert Gefäß offen	9,6 ± 3,0	c	24,0 ± 0,3	c	
Samenmehl nicht autoklaviert Gefäß offen	4,6 ± 1,9	b	8,4 ± 5,5	b	65,0

<sup>1</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ )

### 3.4.7 Einfluss des Samenmehls auf die Wirkung von freigesetztem 2-propenyl-ITC

In einem ergänzenden Versuch wurde der Einfluss der Biomasse des Samenmehls von *B. juncea* (Sorte `Terrafit´) auf die Wirkung einer freigesetzten 2-propenyl-ITC-Menge von 50,0 nmol/g Sand untersucht (Tab. 45). Hier wurde in einer Variante die pure ITC-Verbindung appliziert und in einer weiteren Vergleichsvariante die gleiche ITC-Menge mit einer autoklavierten Samenmehlmenge kombiniert (0,1 Vol.-%), die ca. 50,0 % der ITC-Menge generieren könnte, deren GSL-Myrosinase-System aber inaktiviert war.

Die Applikation von 2-propenyl-ITC führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer Reduzierung keimfähiger Mikrosklerotien um 96,0 %. Bei Anwesenheit des Samenmehls war die Wirkung der ITC-Menge auf 91,9 % leicht verringert.

Tab. 45: Wirkung von 2-propenyl-ITC (50 nmol/g Sand) mit und ohne Samenmehl von *B. juncea* 'Ter-  
rafit' (n=4).

Variante	Mikrosklerotien <sup>1</sup> (Anzahl/g Sand)		Wirkungsgrad (%)
ohne Samenmehl	95,5 ± 5,8	a	-
2-propenyl ITC + autoklaviertes Samenmehl (0,1 Vol.-%)	7,7 ± 2,1	b	91,9
2-propenyl ITC	3,8 ± 1,9	b	96,0

<sup>1</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ )

### 3.4.8 Nicht-GSL-abhängige Wirkung des Samenmehls von *B. juncea*

Eine mögliche nicht GSL-abhängige Wirkung Singrin-haltiger Mehle wurde mit der Applikation von vorbehandelten Samenmehlen überprüft, die kein 2-propenyl-ITC freisetzen. Hierbei handelte es sich um ein entgiftetes und autoklaviertes Samenmehl (siehe 2.1.4.8). In einer Analyse wurde der Singirin-Gehalt des entgifteten *B. juncea* Samenmehls '101' mit 0,2 µmol/g bestimmt. Das autoklavierte Samenmehl wies dagegen eine Konzentration von 88,8 µmol/g auf.

Tab. 46: Wirkung von autoklaviertem und entgiftetem Samenmehl von *B. juncea* '101' mit einer Aufwandmenge von 0,1 Vol.-% in Quarzsand und natürlichen Böden.

Variante	Mikrosklerotien <sup>1</sup> (Anzahl/g Sand)		Wirkungsgrad (%)
<u>Quarzsand</u>			
ohne Samenmehl	95,5 ± 5,8	a	
Samenmehl entgiftet	81,3 ± 21,3	a	15,5
Samenmehl autoklaviert	94,5 ± 5,8	a	7,4
<u>Boden 1</u>			
ohne Samenmehl	7,7 ± 1,0	a	
Samenmehl entgiftet	5,9 ± 1,5	a	24,1
Samenmehl autoklaviert	7,6 ± 0,8	a	4,6
<u>Boden 3</u>			
ohne Samenmehl	25,9 ± 3,6	a	
Samenmehl entgiftet	25,5 ± 1,5	a	3,3
Samenmehl autoklaviert	30,3 ± 2,2	a	0,0
<u>Boden 4</u>			
ohne Samenmehl	23,2 ± 2,4	a	
Samenmehl entgiftet	17,7 ± 0,6	b	23,6
Samenmehl autoklaviert	18,9 ± 0,6	b	18,4

<sup>1</sup>Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ )

Das entgiftete, GSL-freie Samenmehl reduzierte die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien tendenziell etwas stärker als das autoklavierte Mehl (Tab. 46). Die Wirkungen der entgifteten und autoklavierten Variante unterschieden sich im Quarzsand und den Böden 1 und 3 weder untereinander noch gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant. Lediglich im Boden 4 zeigten beiden Samenmehl-Varianten eine signifikante Wirkung gegenüber der Kontrolle.

### 3.5 Praxisversuche

Im Jahr 2011 wurden an 2 Standorten Freilandversuche durchgeführt mit dem Ziel, die Biofumigationswirkung einer Gründüngung mit zwei ausgewählten Sorten von *B. juncea* und *R. sativus* unter praxisnahen Bedingungen zu prüfen. Zusätzlich wurde die Applikation eines Samenmehls untersucht.

Auf dem natürlich verseuchten Standort in Schifferstadt konnten nach der Behandlung in allen Varianten die nahezu doppelte Anzahl an Mikrosklerotien nachgewiesen werden im Vergleich zur Vorbeprobung (Tab. 47). Unter Berücksichtigung dieser natürlichen populationsdynamischen Schwankung zeigten alle Behandlungen keine signifikante Wirkung. Dies spiegelte sich im *Verticillium*-Befall der nachfolgenden Kultur von Romanesco wieder. In allen Varianten lag der Befall mit Befallshäufigkeiten zwischen 71,0 und 88,0 % sowie geringen Befallsstärken zwischen 1,3-2,0 auf einem vergleichbarem Niveau.

Tab. 47: Standort Schifferstadt - Ergebnisse des Freilandversuches 2011

Variante	FM	GSL-/ ITC-Konzentration <sup>1</sup>		Mikrosklerotien <sup>2</sup> (Anzahl/g Boden)		WG <sup>3</sup> (%)	Pflanzenbonitur <sup>4</sup>		
		kg/m <sup>2</sup>	µmol/g TS	nmol/g Boden	vorher		nachher	BH	BS
Kontrolle Schwarzbrache		-	-	20,6 ± 10,8	39,7 ± 4,0		88	1,9	
Kontrolle <i>Phacelia</i>	6,3	-	-	16,3 ± 5,5	33,0 ± 9,6	a	0,0	71	1,3
<i>B. juncea</i> `Terrafit`	1,6	22,0 ± 0,9	65,7	18,7 ± 6,7	34,2 ± 1,9	a	5,1	85	2,0
<i>R. sativus</i> `Defender`	7,9	n.e.	n.e.	20,2 ± 6,7	38,5 ± 8,0	a	0,3	74	1,5
<i>B. juncea</i> `Terrafit` (Samenmehl)	0,2	64,4 ± 1,2	88,9	19,7 ± 6,4	35,8 ± 6,8	a	5,7	81	1,7

<sup>1</sup>GSL-Gehalt und potentiell freisetzbare ITC-Menge bezogen auf Einarbeitungstiefe 10 cm, <sup>2</sup>Mittelwerte nach der Behandlung mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ ), <sup>3</sup>Wirkungsgradberechnung nach Henderson & Tilton, <sup>4</sup>BH = Befallshäufigkeit in %; BS = Befallsstärke 0-5

Auch am Standort Langförden zeigten alle Behandlungen keine signifikante Wirkung gegenüber *Verticillium* (Tab. 48). Nach den Maßnahmen wiesen die vergrabenen Inokulumbutel (siehe auch 2.2.2) nachwievor die ursprüngliche Ausgangsverseuchung von ca. 120,0 MS/g Boden auf. Lediglich die Ausbringung von *B. juncea*-Samenmehl verringerte die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien erkennbar, wengleich die Wirkung nicht signifikant war.

Tab. 48: Standort Langförden - Ergebnisse des Freilandversuches 2011

Variante	FM	GSL-/ ITC-Konzentration <sup>1</sup>		Mikrosklerotien <sup>2</sup> (Anzahl/g Boden)		WG <sup>3</sup> (%)	Pflanzenbonitur <sup>4</sup>	
		kg/m <sup>2</sup>	µmol/g TS	nmol/g Boden	vorher		nachher	BH
Kontrolle Schwarzbrache		-	-	-	123,7 ± 18,5		-	-
Kontrolle <i>Phacelia</i>	6,0	-	-	-	118,1 ± 2,9	a	4,5	-
<i>B. juncea</i> `Terrafit`	6,0	18,1 ± 0,8	87,1	-	122,0 ± 4,8	a	1,4	-
<i>R. sativus</i> `Defender`	8,0	n.e.	n.e.	-	119,7 ± 21,4	a	3,2	-
<i>B. juncea</i> `Terrafit` (Samenmehl)	0,2	64,4 ± 1,2	88,9	-	101,0 ± 18,2	a	18,2	-

<sup>1</sup>GSL-Gehalt und potentiell freisetzbare ITC-Menge bezogen auf Einarbeitungstiefe 10 cm, <sup>2</sup>Mittelwerte nach der Behandlung mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ ), <sup>3</sup>Wirkungsgradberechnung nach Abbott, <sup>4</sup>Pflanzenbonitur entfiel

Die Wirkung von Samenmehl-Applikationen wurde gezielt in zwei Versuchen 2012/2013 untersucht. In einem Gewächshausversuch am Standort Schifferstadt wurden auf einer natürlich verseuchten Fläche verschiedene Aufwandmengen des *B. juncea*-Samenmehls der Sorte `Energy` geprüft. In der Variante `Schwarzbrache` hatte sich die Population keimfähiger Mikrosklerotien im Vergleich zur Vorbeprobung von 4,6 auf 8,4 MS/g Boden nahezu verdoppelt (Tab. 49). Unter Berücksichtigung dieser Populationsschwankung konnte für die Dämpfungsmaßnahme ein Wirkungsgrad von 39,0 % ermittelt werden. Er spiegelte sich in der nachfolgenden Kultur von Rettich in einem deutlich verringerten *Verticillium*-Befall wieder. Blatt- und Wurzelsymptome waren entsprechend geringer ausgeprägt. Die Samenmehl-Applikationen zeigten ab einer Aufwandmenge von 0,25 kg/m<sup>2</sup> Wirkungen. Aufgrund der inhomogenen Verseuchung der Versuchsfläche und der Populationsschwankungen erbrachte der Nachweis der Mikrosklerotien nach der Behandlung inkonsistente Ergebnisse. Immerhin wies die höchste Aufwandmenge mit 1,0 kg/m<sup>2</sup> auch den höchsten Wirkungsgrad von 58,0 % auf. Die Pflanzenbonituren zeigen aber einen mit steigender Aufwandmenge kontinuierlich zurückgehenden *Verticillium*-Befall an.

Der Freilandversuch am Standort Osnabrück auf einer zuvor künstlich verseuchten Fläche war dadurch gekennzeichnet, dass bei Versuchsende von der ursprünglichen Ausgangsverseuchung von 6,0-7,0 MS/g Boden nur noch weniger als die Hälfte nachgewiesen werden konnte (Tab. 50). Unter Berücksichtigung diesen „natürlichen Rückgangs“ der Population wiesen alle Behandlungen mit dem *B. juncea*-Samenmehl der Sorte `Energy´ bei niedrigem Verseuchungsniveau eine signifikante Wirkung auf. Der Wirkungsgrad der Variante mit einer Aufwandmenge von 0,5 kg/m<sup>2</sup> von 50,0 % konnte durch eine Folienabdeckung auf 90,0 % gesteigert werden. Eine Verdoppelung der Aufwandmenge auf 1,0 kg/m<sup>2</sup> erbrachte dagegen eine geringere Wirkungsverbesserung.

Tab. 49: Standort Schifferstadt - Ergebnisse des Gewächshausversuches 2012

Variante	FM	GSL-/ ITC-Konzentration <sup>1</sup>		Mikrosklerotien <sup>2</sup> (Anzahl/g Boden)		WG <sup>3</sup> (%)	Pflanzenbonitur <sup>4</sup>	
		kg/m <sup>2</sup>	µmol/g TS	nmol/g Boden	vorher		nachher	Blatt
Kontrolle Schwarzbrache		-	-	4,6 ± 3,0	8,4	-	7,8	7,9
Dämpfung 10 cm Tiefe		-	-	5,4 ± 3,9	6,0	39,0	4,5	3,3
Samenmehl `Energy´	0,10	70,0	48,2	3,5 ± 4,0	14,8	0,00	8,0	7,1
Samenmehl `Energy´	0,25	70,0	120,6	7,8 ± 6,3	8,8	38,2	8,0	7,2
Samenmehl `Energy´	0,50	70,0	241,1	3,5 ± 2,8	8,4	0,00	7,0	5,6
Samenmehl `Energy´	1,00	70,0	482,2	4,2 ± 3,7	3,2	58,0	6,0	5,7

<sup>1</sup> Geschätzter GSL-Gehalt und potentiell freisetzbare ITC-Menge bezogen auf Einarbeitungstiefe 10 cm, <sup>2</sup> Nach der Behandlung wurde von allen 4 Parzellen einer Variante eine Sammelprobe gezogen. Statistische Verrechnung daher nicht möglich, <sup>3</sup> Wirkungsgradberechnung nach Henderson & Tilton, <sup>4</sup> Bonitur der Blatt- und Wurzelsymptome 1-9

Tab. 50: Standort Osnabrück - Ergebnisse des Freilandversuches 2013

Variante	FM	GSL-/ ITC-Konzentration <sup>1</sup>		Mikrosklerotien <sup>2</sup> (Anzahl MS/g Boden)		WG <sup>3</sup> (%)
		kg/m <sup>2</sup>	µmol/g TS	nmol/g Boden	vorher	
Kontrolle Schwarzbrache		-	-	7,0 ± 0,2	2,9 ± 0,8	a
Samenmehl `Energy´	0,5	70	241,1	6,0 ± 2,5	1,2 ± 1,0	b 50,0
Samenmehl `Energy´ + Folie	0,5	70	241,1	6,8 ± 2,2	0,2 ± 0,2	b 90,0
Samenmehl `Energy´	1,0	70	482,2	7,0 ± 3,3	1,0 ± 0,8	b 70,0

<sup>1</sup> Geschätzter GSL-Gehalt und potentiell freisetzbare ITC-Menge bezogen auf Einarbeitungstiefe 10 cm, <sup>2</sup> Mittelwerte nach der Behandlung mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P \leq 0.05$ ), <sup>3</sup> Wirkungsgradberechnung nach Henderson & Tilton

## 4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Bei der Nutzung des Biofumigationsprinzips können grundsätzlich zwei Verfahren unterschieden werden:

1. Zerkleinerung der GSL-haltigen grünen Pflanzenteile (Triebe, Blätter) einer Kultur von Brassicaceae und Einarbeitung der Grünmasse in den Boden (Gründüngungs-Variante).
2. Ausbringung des aus einer Kultur von Brassicaceae gewonnenen GSL-haltigen Samenmehls mit anschließender Einarbeitung in den Boden (Samenmehl-Variante).

Beide Verfahren weisen jeweils Vor- und Nachteile auf. Ziel des Projektes war es, das **theoretische Biofumigationspotential** der Grünmassen sowie Samenmehle verschiedener Pflanzenarten und Sorten aus der Familie der Brassicaceae zu ermitteln und die unter praktischen Bedingungen zu erwartende **aktuelle Wirkung** der beiden Biomassen gegenüber *Verticillium dahliae* abzuschätzen.

### Toxizität der Isothiocyanate

Zur Bewertung des Biofumigationspotentials von GSL-haltigen Biomassen sind Kenntnisse hinsichtlich des GSL-Profiles (Art und Gehalt der GSL) sowie der spezifischen Toxizität der jeweiligen ITC gegenüber dem Zielorganismus notwendig. Deshalb wurde in einem ersten Schritt die Toxizität verschiedener ITC, die aus den Haupt-GSL der untersuchten Grünmassen und Samenmehle freigesetzt werden, gegenüber *V. dahliae* vergleichend untersucht. Zum Vergleich wurde das von synthetischen Bodenentseuchungsmittel gebildete methyl-ITC, welches in Brassicaceaeen natürlicherweise nicht gebildet wird, in die Untersuchungen mit einbezogen. In den meisten Studien wurde bisher die Toxizität von ITC gegenüber bodenbürtigen Pilzen in Plattentests anhand der Hemmung des Myzelwachstums bestimmt (Manici et al. 1997; Sarwar et al. 1998; Smith und Kirkegaard 2002; Smolinska et al. 2003), obwohl solche Tests nicht der Biologie der Erreger gerecht werden und die Daten kaum auf die Bedingungen im Boden zu übertragen sind. Das Ziel einer Biofumigationsmaßnahme muss die Eliminierung von Mikrosklerotien sein, da sie die Quelle für *Verticillium*-Infektionen darstellen. Vor diesem Hintergrund wurde ein Test entwickelt und erstmalig angewandt, um die Toxizität der ITC gegenüber den Mikrosklerotien unter standardisierten Bedingungen vergleichend zu bestimmen.

Die Ergebnisse (Abb.11, Tab. 20) belegen die letale Wirkung der ITC gegenüber den Mikrosklerotien von *Verticillium* und machen die Unterschiede in ihrer Toxizität deutlich. Zwar weisen die ermittelten LD-Werte zum Teil große Vertrauensintervalle auf. Dies kann auf eine systematische Abweichung vom angenommenen linearen Modell, der ungleichmäßigen Verteilung der ITC im Testsystem oder der unterschiedlichen Sensitivität einer inhomogenen Mikrosklerotien-Population zurückgeführt werden (Finney 1971). Trotzdem zeigen die LD-Werte ein deutliches Muster. Die aromatischen ITC waren

toxischer als die aliphatischen ITC, wobei innerhalb der beiden Gruppen ITC mit zunehmendem Molekulargewicht an Wirksamkeit verlieren. Das Ranking der Toxizität (methyl ITC > 2-propenyl ITC > 4-methylsulfinyl-3-butenyl ITC) und (benzyl ITC > phenylethyl ITC) deutet daraufhin hin, daß die Toxizität mit abnehmender Seitenkettenlänge zunimmt, was in Übereinstimmung mit anderen Studien steht (Sawar et al. 1998; Manici et al. 1997).

Die toxikologischen Parameter wurden in einem sterilen Testsystem ermittelt, in dem ausschließlich die zugeführten ITC für 48 Stunden in Kontakt mit den Mikrosklerotien standen. Eine Übertragung der Daten auf ein natürliches Bodensystem ist schwierig. So war die Toxizität von 2-propenyl-ITC in vielen natürlich verseuchten Böden deutlich geringer (Tab. 21). Die Abnahme der Toxizität war mit einem steigenden Gehalt an organischer Substanz im Boden korreliert, da ITC an organische Verbindungen adsorbiert und biologisch inaktiv werden. Eine ähnlichen Zusammenhang konnten Borek et al. (1995) in ihrer Studie nachweisen. Der mikrobielle Abbau ist ein zweiter potentieller Mechanismus, der für eine ITC-Abnahme und einer verringerten Wirkung verantwortlich gemacht werden kann (Warton et al. 2003; Rumberger und Marschner 2004; Gimsing et al. 2009; Gimsing und Kirkegaard 2009).

Bei der Bewertung der Ergebnisse des 2-propenyl-ITC-Versuches muss die spezielle Biologie des Erregers berücksichtigt werden. Die Mikrosklerotien werden im abgestorbenen Gewebe der Wirtspflanzen in großen Mengen gebildet und verbleiben über viele Jahre im Boden lebensfähig. Zusätzlich vermag *Verticillium* auch die Wurzeln von Nicht-Wirtspflanzen zu besiedeln und dort Mikrosklerotien auszubilden. Deshalb sollte es das Ziel einer Bodenentseuchungsmaßnahme sein, die Population des Erregers möglichst umfassend zu eliminieren, d. h. Wirkungsgrade von über 80 % zu erzielen. Bei deutlich geringerer Wirkung droht die Gefahr, dass das im Boden reichlich verbleibende Inokulum als Ausgangspunkt für Neuinfektionen und einem schnellen Wiederaufbau der Mikrosklerotien-Population fungiert. **Die Ergebnisse deuten nun darauf hin, dass in vielen Böden - in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften - deutlich mehr als 150,0 nmol ITC/g Boden für eine solch ausreichende Wirkung gegenüber *Verticillium* benötigt werden.** Zusätzlich erweisen sich bei dieser Bewertung die empfohlenen Aufwandmengen kommerzieller Bodenentseuchungsmittel, die methyl-ITC - einem 2-propenyl-ITC toxisch gleichwertigen ITC (Tab. 20) - freisetzen, als hilfreich. Hierbei werden schließlich methyl-ITC-Konzentrationen zwischen 517 bis 1294 nmol/g Boden erzielt (Brown et al. 1991), die sich in zahlreichen Versuchen als ausreichend wirksam gegenüber *Verticillium* herausgestellt haben (Tsor et al. 2005; Triky-Donan et al. 2007).

### Theoretisches Biofumigationspotential von Grünmassen

Eine größere Anzahl von Sorten vier verschiedener Pflanzenarten wurde über drei Jahre im Freiland angebaut, um ihre Biomasse-Produktion und die GSL-Gehalte als Grundlage für die Bestimmung des theoretischen Biofumigationspotentials zu ermitteln. Die Sorten von *B. juncea* produzierten hierbei Sinigrin-Mengen (Tab. 22-24), die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien stehen

(Kirkegaard und Sawar 1998; Morra und Kirkegaard 2002; Belostas et al. 2004). Errechnet man die maximal freisetzbare Menge von 2-propenyl-ITC unter Feldbedingungen, dann ergeben sich für den Anbau 2011 Konzentrationen von bis zu 89,4 nmol/g Boden. Zu wenig angesichts der Tatsache, dass in vielen Böden weit mehr als 150,0 nmol/g Boden für eine ausreichende Kontrolle notwendig sind (s.o.). Günstiger sind die Berechnungen für den Anbau 2012 mit deutlich höheren Werten bzw. maximal erzielbaren Konzentrationen von bis 273,0 nmol/g Boden für Sorten von *B. juncea* und *B. carinata*.

Die verschiedenen Sorten von *R. sativus* beinhaltenen Raphsatrin als GSL-Hauptkomponente. Trotz des hohen Biomasseertrages reichten die GSL-Konzentrationen theoretisch nicht aus, um vom 4-methylthio-3-butenyl-ITC mehr als 150,0 nmol/g Boden freizusetzen (Tab. 25-26). Da dieses ITC dem in den toxikologischen Untersuchungen verwendeten 4-methylsulfinyl-3-butenyl-ITC strukturell ähnlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass es ebenfalls eine deutlich geringere Toxizität im Vergleich zu 2-propenyl-ITC aufweist. Vor diesem Hintergrund kann das theoretische Biofumigationspotential der Sorten als eher gering eingestuft werden. Die für *E. sativa* ermittelten Daten führen zu einer ähnlichen Bewertung (Tab. 29).

Eine andere Situation liegt bei den geprüften Sorten von *S. alba* vor. Zwar wiesen die Grünmassen sehr geringe Tropaeolin-Konzentrationen auf (Tab. 27-28), die mit den Ergebnissen einer Studie von Kirkegaard und Sawar (1998) übereinstimmen. Allerdings kann das aus Tropaeolin freigesetzte aromatische benzyl-ITC als deutlich toxischer im Vergleich zu den aliphatischen ITC bewertet werden, so dass die relativ geringen maximal freisetzbaren ITC-Mengen von bis zu 19,1 nmol/g Boden eine deutliche Wirkung entfalten könnten.

Setzt man die aufgrund der GSL-Gehalte und Biomasseerträge kalkulierten, maximal erzielbaren ITC-Konzentrationen im Boden in Relation zu den toxikologischen Kennwerten der jeweiligen ITC, ist eine Klassifizierung des theoretischen Biofumigationspotentials der geprüften Genotypen möglich (Tab.30). Den meisten Genotypen konnte auf diese Weise zumindest ein mittleres Potential mit theoretischen Wirkungen zwischen 50,0-90,0 % gegenüber *Verticillium* zugesprochen werden. Für einige Sorten von *S. alba* und *B. juncea* konnte in Abhängigkeit des Anbaujahres ein hohes Potential mit theoretischen Wirkungsgraden > 90,0 % prognostiziert werden.

### **Aktuelle Wirkung von Grünmassen**

Das theoretische Wirkungspotential einer Grünmasse spiegelt aber nicht das reale Wirkungspotential wieder. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die in einem natürlichen Boden unter praktischen Bedingungen zu erwartende, sog. aktuelle Wirkung der Grünmasse verringert ist (Abb. 1). So beeinflussen zahlreiche endogene und exogene Faktoren wie die Myrosinase-Aktivität im Gewebe bzw. Bodentemperatur und -feuchtigkeit sowie Zerkleinerungsgrad des Gewebes die Hydrolyse, d. h.

die Umsetzung der GSL in ITC. Zusätzlich kann die Toxizität der ITC durch andere Pflanzeninhaltsstoffe beeinflusst werden. Darüber hinaus wird die Wirkung von der Verweildauer der ITC im Boden bestimmt, die wiederum durch Sorption der ITC an organische Substanz, ihren mikrobiellen Abbau oder Verflüchtigung erheblich verringert werden kann. Eine zielgerichtete Evaluierung von Grünmassen verschiedener Genotypen hinsichtlich ihrer Nutzung für ein Biofumigationsverfahren setzt deshalb eine Erfassung ihrer realen Wirkungen unter praxisnahen Bedingungen unter Einbeziehung der oben genannten Einflussfaktoren voraus. Eine entsprechende Prüfung zahlreicher Pflanzenarten und -sorten in Feldversuchen ist sehr aufwendig. Aufgrund der Inhomogenität einer Versuchsfläche, sowohl hinsichtlich der Mikrosklerotien-Verseuchung als auch der verschiedenen Einfluss nehmenden Bodenfaktoren, lassen sich kaum reproduzierbare Ergebnisse gewinnen. Ein ermitteltes reales Wirkungspotential für eine Grünmasse wäre ohnehin nur auf den jeweiligen Standort mit seinen spezifischen Bodeneigenschaften bezogen und könnte nicht auf andere Flächen übertragen werden.

Vor diesem Hintergrund wurde ein sehr effizienter Laborbiotest entwickelt, um das Biofumigationspotential zahlreicher Genotypen unter standardisierten Bedingungen vergleichend zu evaluieren. Im Hinblick auf die Biofumigationswirkung waren die Bedingungen optimiert. Die Nutzung von gefriergetrocknetem und vermahlenem, d. h. auf Zellebene gleichmäßig zerstörtem Gewebe sowie ideale Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen sollten eine möglichst vollständige Umwandlung der GSL in ITC sicherstellen. Die Verwendung eines sterilen Quarzsandes ohne beeinflussende Bodenfaktoren ( $C_{\text{org}}$ -Gehalt, Mikroorganismen) in gasdicht verschlossenen Gefäßen (Verflüchtigung) maximierte die Verweildauer der ITC im Boden und ihre Wirkung auf die Mikrosklerotien. Schließlich wurde der Test nach 48 Stunden gestoppt, um zu verhindern, dass eine vom Gewebepulver ausgehende zunehmende mikrobielle Aktivität den Biofumigationseffekt überlagert.

Unter den idealisierten Bedingungen des Biotestes wurde die maximale Biofumigationswirkung der Grünmassen erfasst. Hier darf aber eine Wirkung unterhalb der theoretischen Wirkung (s. o.) angenommen werden, denn wirkungsminderte Faktoren, wie z. B. ein geringe Myrosinase-Aktivität oder der Einfluss der organischen Substanz „Grünmasse“ auf die von ihr selbst freigesetzten ITC, konnten sich im Testsystem entfalten.

Im Biotest konnten die Grünmassen der Sorten von *B. juncea* die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien um 70,0-80,0 % reduzieren (Tab. 32). Sie konnten potentielle 2-propenyl-Konzentrationen zwischen 50,6 und 78,1 nmol/g Sand produzieren. Nach Warton et al (2001) kann bei gefriergetrocknetem *B. juncea*-Gewebe aber nur mit einer maximalen ITC-Freisetzungsrate von ca. 75,0 % gerechnet werden. Unter Annahme dieser Rate wären reale ITC-Mengen zwischen 40,0 und 60,0 nmol/g Sand von den Grünmassen freigesetzt worden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die applizierte Biomasse das freigesetzte 2-propenyl-ITC kaum adsorbierte und in seiner Wirkung reduzierte (Tab. 33). Die angenommenen ITC-Konzentrationen zeigten im Biotest Wirkungen, die mit der in einem ähnlichen Testsystem ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurve für 2-propenyl (Tab. 19) korrespondieren. Dies

zeigt, dass die Wirkung der Grünmassen gegenüber *Verticillium* ein deutlich ITC-bezogener Biofumigationseffekt war.

Die Grünmassen der Sorten von *R. sativus* und *S. alba* waren im Biotest mit Wirkungsgraden zwischen 9,9-37,5 % deutlich weniger effektiv (Tab. 32). Bei *R. sativus* kann dies auf die zu geringen GSL-Gehalte bzw. potentiell freisetzbaren ITC-Mengen oder eine ungenügende Umwandlung der GSL in ITC zurückgeführt werden. Die Gewebe einiger Sorten von *S. alba* konnten potentielle Mengen von benzyl-ITC in der Nähe des LD<sub>90</sub>-Wertes von 8,6 nmol/g Boden produzieren. Trotzdem war die Wirkung der zugesetzten Grünmassen sehr gering. Wahrscheinlich wurde das freigesetzte benzyl-ITC unmittelbar an organische Verbindungen der Grünmasse selbst gebunden und inaktiviert. Darauf deuten die Ergebnisse des Versuches zum Einfluss der Biomasse auf die Wirkung der ITC hin (Tab. 33). Hier reduzierte die Anwesenheit von autoklaviertem, inaktivem Gewebe die Wirkung von benzyl-ITC um das siebenfache im Vergleich zu 2-propenyl-ITC. Nach Gimsing et al. (2009) kann dies auf die unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften der beiden ITC zurückgeführt werden. So wird benzyl-ITC - die hydrophobere der beiden ITC - wesentlich stärker an organische Substanz gebunden als 2-propenyl-ITC. Dies schließt eine Nutzung der Grünmassen von *S. alba* für die Biofumigation aus.

Vergleicht man die Ergebnisse der im Biotest geprüften Grünmassen aus dem Anbaujahr 2011 mit dem jeweils zuvor ermittelten theoretischen Biofumigationspotential (Tab. 30), wird deutlich, dass lediglich bei *B. juncea* und *E. sativa* eine Übereinstimmung vorliegt. Bei *R. sativus* und *S. alba* stehen die niedrigen Wirkungsgrade von < 50,0 % im Biotest im Gegensatz zum „mittleren“ theoretischen Biofumigationspotential mit prognostizierten Wirkungen zwischen 50,0-90,0 %. Wenn schon in einem idealisierten Testsystem die Wirkungen bestimmter Genotypen gering ausfallen, dann ist zu erwarten, dass diese in näher an realen Bedingungen ausgerichteten Testsystemen oder unter Feldbedingungen noch schlechter sind. **Insofern kann der entwickelte Biotest als ein effektives Instrument zur Vorauswahl geeigneter Genotypen für nachfolgende Untersuchungen, wie z. B. Feldversuche angesehen werden. Deutlich wird aber auch, dass zur Evaluierung von Pflanzenarten und -sorten für die Biofumigation ein auf der Grundlage von Biomasseertrag und GSL-Gehalt sowie toxikologischen `in vitro`-Kennwerten ermitteltes theoretisches Biofumigationspotential von der realen Wirkung deutlich abweichen kann und deshalb nicht ausreicht.**

Im Biotest mit idealisierten Bedingungen zeigten die Sinigrin-haltigen Grünmassen von *B. juncea* Wirkungen, die eine Anwendung in der Praxis als interessant erscheinen lassen. Unter natürlichen Bedingungen ist die reale Wirkung aber erheblich reduziert. Dies wird schon deutlich, wenn im Testsystem statt eines sterilisierten Sandes natürliche Böden verwendet werden. So reduzierte die Grünmasse der Sorte `Energy` die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien in sechs verschiedenen natürlich verseuchten Böden in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften nur noch zwischen 10,0 und 66,0 % (Tab. 34).

Es muss davon ausgegangen werden, dass unter Feldbedingungen die Wirkung einer Gründüngung mit *B. juncea* noch weitaus geringer ausfällt, da die zu erwartenden aktuellen ITC-Konzentrationen im Boden weitaus niedriger sein dürften, als im Biotest. Dies ist zurückzuführen auf die unvollständige Zerkleinerung der Grünmasse mittels eines Schlegelmulchers und einer daraus resultierenden niedrigen ITC-Freisetzungsrates, wohingegen im Biotest stets gefriergetrocknetes, vermahlene Gewebepulver mit einem maximalen Zellzerstörungsgrad verwendet wurde. So konnten in einigen Studien für *B. juncea* unter Feldbedingungen lediglich ITC-Freisetzungsraten zwischen 1,0 und 55,0 % ermittelt werden (Morra und Kirkegaard 2002; Gimsing und Kirkegaard 2006; Gimsing und Kirkegaard 2009). Zusätzlich dürften bei offenen Böden im Vergleich zu den geschlossenen Gefäßen des Biotestes größere ITC-Verluste durch Verflüchtigung zu erwarten sein. Diese Einschätzung wird durch die Ergebnisse der 2011 durchgeführten Freilandversuche bestätigt. Am Standort 'Schifferstadt' wies die *B. juncea*-Gründüngung trotz einer potentiell freisetzbaren 2-propenyl-ITC-Menge von 65,7 nmol/g Boden im Vergleich zu einer *Phacelia*-Variante keine signifikante Wirkung gegenüber *Verticillium* auf. Auch die Einarbeitung von *R. sativus* zeigte erwartungsgemäß keine Wirkung. Ein zweiter Versuch am Standort 'Langförden' erbrachte die gleichen negativen Ergebnisse (Tab. 47-48).

**Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die geprüften Genotypen bei einer Gründüngung nicht jene ITC-Mengen freisetzen können - im Gegensatz zu methyl-ITC bildenden synthetischen Mitteln -, die in natürlichen Böden für eine ausreichende Eliminierung der Mikrosklerotien notwendig wären.** Selbst die potentiell erzielbaren ITC-Konzentrationen von Pflanzensorten mit hohen GSL-Gehalten und/oder Biomasseproduktion erscheinen zu gering angesichts der toxikologisch erforderlichen ITC-Mengen und der Tatsache, dass in der Praxis durch organische Substanz, mikrobielle Aktivität und Verflüchtigung die Verweildauer der ITC im Boden und ihre Wirkung reduziert werden. Gleichzeitig stehen - außer der Züchtung von Pflanzensorten mit höheren GSL-Gehalten - kaum weitere Ansätze zur Verfügung, um dieses Verfahren der Biofumigation ausreichend zu optimieren.

### **Biofumigationspotential von Samenmehlen**

Bei vielen Brassicaceae weisen die reifen Samen GSL-Gehalte auf, die jene, die in Blättern und Trieben ermittelt werden, um ein vielfaches übertreffen können. Hinsichtlich der Pflanzenentwicklung sind zum Zeitpunkt der Samenreife die höchsten flächenbezogenen GSL-Mengen vorhanden. Aus anbautechnischer Sicht ist dies aber ein zu später Zeitpunkt für eine Einarbeitung. Eine Zerstörung der Samenkörner ist beim Mulchvorgang nur schwer zu erzielen, während gleichzeitig eine unerwünschte Samenverseuchung des Bodens droht (Bellostas et al. 2004). Gleichwohl eröffnet der hohe GSL-Gehalt der Samen die Perspektive einer alternativen Anwendung der Biofumigation. Nach der Entfernung des Ölanteils durch Kaltpressung kann der verbliebene GSL-haltige Samenschrot, auch als Samenmehl bezeichnet, als biologisches Entseuchungsmittel gezielt auf Flächen ausgebracht und eingearbeitet werden. Das Samenmehl lässt sich im trockenen Zustand ohne gravierende Verluste

des GSL-Gehaltes und der Myrosinase-Aktivität lagern. Erst durch Einwirkung von externer Feuchtigkeit wird nach der Einarbeitung in den Boden die Hydrolyse in Gang gesetzt. Die Anwendung wird - im Gegensatz zur Gründüngung - deshalb nicht durch saisonale Anbaupraktiken bzw. der Nichtverfügbarkeit einer ausreichenden Wachstumsperiode in der Fruchtfolge eingeschränkt (Mazzola und Zhao 2010). Samenmehle können vielmehr unabhängig vom Anbau auf entsprechenden Zielflächen ausgebracht werden. Darüber hinaus sind weitere Anwendungsvorteile vorhanden. Durch Erhöhung der Aufwandmenge lässt sich die ITC-Konzentration im Boden bzw. Wirkung steigern. Schließlich kann davon ausgegangen werden, dass die gleichmäßige Verteilung einer pulverähnlichen Biomasse im Boden - im Vergleich zu Gründüngung - zu einer Wirkungsverbesserung beiträgt. In zahlreichen Studien konnte die Biofumigationswirkung von GSL-haltigen Samenmehlen gegenüber bodenbürtigen Schädlingen und Pilzen sowie Samen von Unkräutern nachgewiesen werden (Brown und Morra 2005). Ziel des Projektes war es, erstmalig die Samenmehle verschiedener Pflanzenarten und -sorten aus der Familien der Brassicaceae systematisch hinsichtlich ihres Biofumigationspotentials gegenüber *Verticillium dahliae* zu evaluieren, und somit die Grundlagen für die Entwicklung einer zukünftigen praktischen Anwendung des Verfahrens zu schaffen.

#### Sinigrin-haltige Samenmehle von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra*

In einem ersten Schritt wurden - analog zu den Grünmassen - die GSL-Profile der Samenmehle bestimmt. In den Samenmehlen der Sorten von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* konnte erwartungsgemäß lediglich die GSL-Hauptkomponente Sinigrin nachgewiesen werden. Die 2011 von den Züchtern bezogenen Samen bzw. Mehle wiesen - mit Ausnahme der *B. nigra*-Sorte 'M24' - Sinigrin-Gehalte von ca. 100,0  $\mu\text{mol/g}$  auf (Tab. 35). Diese Gehalte konnten 2012 in Mehlen aus eigenem Anbau nochmalig bestätigt werden (Tab. 36). In der Literatur werden allerdings für Samenmehle von *B. juncea* und *B. carinata* höhere Sinigrin-Gehalte von durchschnittlich ca. 150,0  $\mu\text{mol/g}$  angegeben (Vaughn et al 2006; Hansson et al. 2008; Galletti et al. 2008; Henderson et al. 2009; Furlan et al. 2010). Mazzola et al. (2007) sowie Mazzola und Zhao (2010) setzten in ihren Versuchen gar ein *B. juncea*-Mehl mit einem Sinigrin-Gehalt von 303,0  $\mu\text{mol/g}$  ein. Die höheren Sinigrin-Mengen mögen auf andere Anbaubedingungen und Sorten zurückzuführen sein.

Unter der konservativen Annahme einer Aufwandmenge von 250  $\text{g/m}^2$  könnten die geprüften Samenmehle potentiell 2-propenyl-ITC in Mengen von bis zu 190,0  $\text{nmol/g}$  Boden freisetzen (Tab. 35 und 36). Dies ist deutlich mehr als die entsprechenden Grünmassen der jeweiligen Sorten produzieren können und zeigt schon das höhere Biofumigationspotential dieser besonderen Form der Biomasse an. Zumal beim Samenmehl im Vergleich zur gemulchten Grünmasse eine deutlich höhere aktuelle Freisetzungsrate erwartet werden kann. Mittels spektralphotometrischer Analyse konnten für die Samenmehle von *B. juncea* und *B. carinata* unter optimalen Bedingungen Freisetzungsraten von 2-propenyl-ITC zwischen 62,5 und 100 % ermittelt werden. Hierbei scheint es sortenabhängige Un-

terschiede zu geben (Tab. 40). Eine ähnliche ITC-Freisetzungsrate von 77,0 % konnten Leoni et al. (2004) für ein *B. carinata*-Mehl bestimmen. Einschränkend muss hier hinzugefügt werden, dass in unserer Versuchsreihe gefriergetrocknetes, fein vermahlendes Samenmehl verwendet wurde. Es weist deshalb einen höheren Zerkleinerungsgrad im Vergleich zum unbehandelten Samenmehl, welches in den Labor- und Freilandversuchen zur Anwendung kam, auf und eine etwas höhere Freisetzungsrate. So wiesen Mazzola und Zhao (2010) in ihren Versuchen nach, dass ein *B. juncea*-Mehl mit einer Partikelgröße von < 1,0 mm höherer ITC-Mengen freisetzt als ein Mehl mit einer Partikelgröße von 2,0-4,0 mm.

Im Biotest zeigten insbesondere die Samenmehle aller Sorten von *B. juncea* bei einer Aufwandmenge von 0,4 Vol.-% eine sehr gute Wirkung gegenüber *Verticillium*, indem sie alle Mikrosklerotien eliminierten (Tab. 41). Die Mehle konnten in den Gefäßen maximal 2-propenyl-ITC in Konzentrationen von 107,0-127,0 nmol/g Sand freisetzen. Unter der Annahme einer Freisetzungsrate von 80,0 % können reale ITC-Konzentrationen von 86,0-102,0 nmol/g Sand angenommen werden. Gleichzeitig konnte in einem ergänzenden Versuch gezeigt werden, dass die Samenmehl-Biomasse das von ihr freigesetzte 2-propenyl-ITC nur geringfügig bindet bzw. in seiner Wirkung mindert (Tab. 45). Vergleicht man nun die angenommenen realen 2-propenyl-Konzentrationen (s. o.) mit der in den toxikologischen Untersuchungen für 2-propenyl-ITC ermittelten Dosis-Wirkungskurve (Tab. 19), können ca. 90,0 % der vollständigen Wirkung im Biotest als ein ITC-bezogener Biofumigationseffekt erklärt werden. Der Rest der Wirkung ist vermutlich als ein nicht GSL-abhängiger Effekt zu interpretieren. Darauf deuten die Ergebnisse der Versuchsreihe mit entgiftetem und autoklavierten *B. juncea*-Samenmehl hin (Tab. 46). Wie in der Studie von Smolinska et al. (1997) war nach dem Entgiftungsvorgang das Samenmehl nahezu GSL-frei während das Autoklavieren zwar die Myrosinase-Aktivität blockierte aber den GSL-Gehalt kaum beeinflusste. Beide behandelten Mehle konnten somit keine ITC freisetzen, zeigten aber dennoch schon bei einer Aufwandmenge von 0,1 Vol.-% im Quarzsand und natürlichen Böden eine geringe Wirkung. Insbesondere das entgiftete Mehl konnte die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien im Quarzsand um 15,0 % und in natürlichen Böden um bis zu 25,0 % reduzieren. Der „Nicht-GSL-Effekt“ kann unter Umständen auf große Mengen gering-toxischer volatiler S-haltiger Verbindungen zurückgeführt werden, die beim Abbau des Gewebes entstehen und nicht von GSL-Verbindungen herrühren (Bending und Lincoln 1999). Da das entgiftete und nichtsterile Mehl im Vergleich zum autoklavierten sterilen Mehl eine tendenziell höhere Nicht-GSL-Wirkung aufwies, kann auch ein zusätzlicher mikrobieller Effekt diskutiert werden.

Wie bei der Grünmasse konnte auch beim Samenmehl gezeigt werden, dass seine Biofumigationswirkung in einem natürlichen Boden in Abhängigkeit seiner Eigenschaften erheblich verringert ist. So konnte in Dosis-Wirkungs-Versuchen (Abb. 16) für den sterilen Quarzsand ein ED<sub>90</sub>-Wert - bezogen auf die Aufwandmenge - von 0,11 Vol.-% errechnet werden (Tab. 43). Für die sechs natürlichen Böden wurden dagegen ED<sub>90</sub>-Werte von 0,51 - 2,21 Vol.-% ermittelt. Zwar konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Wirkung und dem C<sub>org</sub>-Gehalt der Böden festgestellt werden, jedoch war die

Wirkung des *B. juncea*-Samenmehls in den beiden Böden (5 und 6) mit den höchsten  $C_{org}$ -Gehalt von  $> 3,0$  auch am geringsten. Darüber hinaus dürften weitere Faktoren, wie die mikrobielle Aktivität oder Bodentextur, für die unterschiedlichen Wirkungen verantwortlich sein.

Im Quarzsand und in den Böden 1 und 5 wurde die reale ITC-Freisetzung nach Applikation des *B. juncea*-Mehls mit einer Aufwandmenge von 0,4 Vol.-% mittels spektralphotometrischer Analyse über 48 Stunden hinweg erfasst (Abb. 18). Der Höhepunkt der Bildung von 2-propenyl-ITC wurde bereits 3h nach Einmischung des Mehls festgestellt. Anschließend nahm bis zum Versuchsende die Konzentration kontinuierlich bis auf ein Fünftel ab. Einen gleichen Freisetzungsverlauf von 2-propenyl-ITC nach Ausbringung eines Sinigrin-haltigen Samenmehls konnten D'Avino et al. (2004) sowie Mazzola und Zhao (2010) beobachten. In unserer Studie erscheinen allerdings die unterschiedlichen Freisetzungsverläufe in den Böden widersprüchlich. Während im Quarzsand und Boden 1 nahezu gleiche Mengen gemessen wurden, konnten im Boden 5 stets fast doppelt so hohe Konzentrationen nachgewiesen werden. Hierbei entspricht der 6 h nach Applikation ermittelte Höchstwert von ca. 95,0 nmol/g Boden (Abb. 18) ziemlich genau der zu erwartenden realen ITC-Menge, wenn man bei gegebenen Sinigrin-Gehalt des Mehles der Sorte 'Energy' von 91,0  $\mu\text{mol/g}$  und einer Aufwandmenge von 0,4 Vol.-% von einer potentiellen ITC-Konzentration von 125,0 nmol/g Boden ausgeht und zusätzlich eine Freisetzungsrate von 80,0 % annimmt. Widersprüchlich erscheinen die Messungen aber deshalb, da die höchsten ITC-Mengen in jenem Boden 5 festgestellt wurden, in dem das Samenmehl die geringste Wirkung aufweist (Tab. 43). Der hohe  $C_{org}$ -Gehalt von 3,2 % könnte hierfür eine Erklärung liefern, denn er bindet umfangreich das freigesetzte 2-propenyl-ITC (und mindert die Wirkung). Das „gebundene“ ITC wird anschließend mittels Methanol - neben dem in der Bodenlösung sich befindlichen ITC - extrahiert und miterfasst. Dagegen werden im Quarzsand bzw. Boden 1 mit deutlich geringerem  $C_{org}$ -Gehalt (1,06 %) auch geringere ITC-Mengen an organische Substanz adsorbiert. In der Folge können größere Mengen des volatilen 2-propenyl-ITC in den „Headspace“-Raum der Gefäße entweichen, wo sie bei der Analyse nicht miterfasst werden.

Die für die Böden 1-6 berechneten  $ED_{90}$ -Werte (Tab. 43) entsprechen Aufwandmengen des *B. juncea*-Samenmehls von ca. 2,5 bzw. 11,0 t/ha. Bei einem angenommenen Sinigrin-Gehalt von ca. 100,0  $\mu\text{mol/g}$  und einer Freisetzungsrate von 80,0 % sowie einer Einarbeitungstiefe von 10 cm würden ITC-Konzentration von ca. 150,0-600,0 nmol/g Boden erzielt. Dies steht im Einklang mit den toxikologischen Untersuchungen und der daraus gewonnenen Erkenntnis (s. o.), dass in Abhängigkeit der Bodeneigenschaften 2-propenyl-ITC-Konzentrationen von 150,0 nmol/g Boden und deutlich mehr erforderlich sind, um eine ausreichende Wirkung gegenüber *Verticillium* zu erzielen. Brown und Morra (2005) gehen in ihrer Hochrechnung von einem GSL-Gehalt von 250,0  $\mu\text{mol/g}$  und einer niedrigen ITC-Freisetzungsrate von 20,0 % aus. Hier würden Samenmehlausbringungen von 2,7 Vol.-% eine Konzentration von ca. 500,0 nmol/g Boden freisetzen. Sie fordern deshalb Mehle, die GSL-Gehalte von deutlich mehr als 200,0  $\mu\text{mol/g}$  aufweisen.

Hinsichtlich der in der Praxis erforderlichen Aufwandmengen geben die Feldversuche noch etwas Auskunft. Allerdings muss bei diesen Versuchen berücksichtigt werden, dass die Inhomogenität der Versuchsfläche - insbesondere im Hinblick auf die *Verticillium*-Verseuchung - einen großen Versuchsfehler bedingt, der geringe Biofumigationswirkungen überlagert und kaum erkennen lässt. Dazu tragen auch natürliche Veränderungen der Keimfähigkeit der Mikrosklerotien bei, die durch exogene, noch weitgehend unbekannte Faktoren beeinflusst wird. So ist derzeit davon auszugehen, dass mittels des *Verticillium*-Testes jeweils nur ein Teil der Mikrosklerotien-Population erfasst wird, während der Rest sich in einer Art Keimruhe befindet. Dies erklärt z. B. die Verdoppelung der Mikrosklerotien innerhalb des Versuchszeitraumes im Freilandversuch 2011 am Standort Schifferstadt (Tab. 48).

Unter diesen widrigen Bedingungen konnten in den Freilandversuchen 2011 an beiden Standorten mit Samenmehl-Behandlungen der *B. juncea*-Sorte 'Terrafit' in einer Aufwandmenge von 200,0 g/m<sup>2</sup> (= 2,0 t/ha) keine signifikanten Wirkungen erzielt werden, obwohl potentiell 88,9 nmol ITC/g Boden freigesetzt werden konnten (Tab. 48 und 49). Im Gewächshausversuch 2012 - ebenfalls gekennzeichnet durch eine erhebliche Streuung der Daten - zeigten höhere Aufwandmengen ab 250-500 g/m<sup>2</sup> tendenziell eine Wirkung (Tab. 49). Auch im Versuch 2013 wurde deutlich, dass eine Aufwandmenge von 500 g/m<sup>2</sup> notwendig ist, um eine signifikante Wirkung an diesem Standort zu erzielen (Tab. 50). In Kombination mit einer Folienabdeckung wurde die Wirkung mehr gesteigert als durch eine Verdoppelung der Aufwandmenge auf 1000 g/m<sup>2</sup>. Dies steht im Einklang mit zuvor durchgeführten Laborversuchen mit geschlossenen und offenen Gefäßen. In Abhängigkeit der Bodeneigenschaften wurden bei Verwendung von Gefäßen ohne Abdeckung mehr oder weniger große Wirkungsminierungen beobachtet (Tab. 44). Im sandigen Boden 1 mit geringem C<sub>org</sub>-Gehalt betrug der Wirkungsverlust im offenen Gefäß ca. 50,0 %, wohl bedingt durch ITC-Verluste über Verflüchtigung. Price et al. (2005) untersuchten die Freisetzung von 2-propenyl-ITC nach Applikation eines *B. juncea*-Gewebes unter verschiedenen Bedingungen. Sie konnten in einem Boden mit Abdeckung eine um 56,0 % höhere ITC-Konzentration feststellen. Bei einer Temperatur von 45 °C war die ITC-Konzentration um 81,0 % höher als bei 15 °C. Sie schlussfolgern daraus, dass eine Folienabdeckung sehr sinnvoll sein könnte, da sie die Temperatur erhöht und ITC-Verluste durch Verflüchtigung mindert.

**Weiteren Versuchen bleibt es zukünftig vorbehalten, bei Sinigrin-haltigen Samenmehlen die für eine ausreichende Wirkung erforderlichen Aufwandmengen mit und ohne Folienabdeckung in Abhängigkeit der Standorteigenschaften zu ermitteln. Schließlich gilt es untersuchen, inwieweit die Herstellung entsprechender Samenmehlmengen und ihre Ausbringung sowohl für den Produzenten als auch den Anwender ökonomisch tragfähig sind.**

#### Samenmehle von *E. sativa* und *R. sativus*

Unter den nicht Sinigrin-haltigen Samenmehlen zeigte das Mehl von *E. sativa* im Biotest eine ähnlich gute Wirkung wie die Mehle von *B. juncea* (Tab. 41). Sie kann auf den hohen GSL-Gehalt von 94,5

$\mu\text{mol/g}$  zurückgeführt werden (Tab. 37), der zu 94,0 % aus dem GSL Erucin bestand. Dieses GSL-Profil stimmt mit dem von Lazzeri et al. (2004) für ein Mehl von *E. sativa* ermitteltem Profil überein. Die fast vollständige Eliminierung der Mikrosklerotien kann - analog zu den Mehlen von *B. juncea* - mit der potentiell freisetzbaren Menge aliphatischer ITC in Höhe von 110,0 nmol/g Sand und ggf. einem geringen Nicht-GSL-Effekt hinreichend erklärt werden.

In den Samen von *R. sativus* konnte lediglich das auch in der Grünmasse vorhandene Haupt-GSL 4-methylthio-3-butenyl (Raphsatin) nachgewiesen werden (Tab. 38). Das von Sang et al. (1984) beschriebene GSL 4-methylsulfanyl-3-butenyl (Raphenin) wurde nicht gefunden. Allerdings wurden im Gegensatz zum Blattgewebe nur sehr geringe Mengen von 1,7-5,0  $\mu\text{mol/g}$  in den verschiedenen Mehlen detektiert, die für eine signifikante ITC-bezogene Biofumigationswirkung nicht ausreichen dürften. Dennoch zeigten die Mehle von *R. sativus* im Biotest hohe Wirkungsgrade von 67,0 bis 87,8% (Tab. 41). Diese können nur auf eine ausgeprägte Nicht-GSL-Wirkung oder andere Effekte zurückgeführt werden, die in weiteren Versuchen aufzuklären sind. Aufgrund der deutlichen Wirkungen, die mit einer Applikation dieser Samenmehle erzielt werden konnten, sollten sie in der weiteren Forschungs- und Entwicklungsarbeit berücksichtigt werden.

#### Samenmehle von *S. alba* und *B. napus*

In den Samenmehlen von *S. alba* konnte Sinalbin bzw. 4-hydroxybenzyl in Konzentrationen von 116,7-133,4  $\mu\text{mol/g}$  gemessen werden (Tab. 38). Borek und Morra (2005) wiesen im Samen von *S. alba* ebenfalls Sinalbin als Haupt-GSL in ähnlicher Konzentration nach. Sie verweisen darauf, dass das freigesetzte 4-hydroxybenzyl-ITC sehr instabil ist und direkt weiter zu einem Thiocyanat-Ion bzw.  $\text{SCN}^-$  abgebaut wird.  $\text{SCN}^-$  habe pytoxische Eigenschaften und wird für die herbizide Wirkung von *S. alba*-Samenmehlen verantwortlich gemacht. Eine fungizide Wirkung gegenüber *Verticillium* ist nicht vorhanden, denn die geprüften Samenmehle zeigten im Biotest allesamt keinerlei Wirkung (Tab. 41). Dies ist letztendlich auch darauf zurückzuführen, dass der Samen im Vergleich zur Grünmasse kein Tropaeolin enthält, das sehr bioaktives benzyl-ITC freisetzen könnte.

Auch die geprüften Samenmehle von *B. napus* müssen als weitgehend wirkungslos eingestuft werden. Im Gegensatz zu den Mehlen anderer Pflanzenarten weisen sie ein vielfältigeres GSL-Profil auf. In den Samen wurden von den ITC-freisetzenden GSL vor allem Gluconapin (3-butenyl) in Konzentration bis zu 46,7  $\mu\text{mol/g}$  und in geringerer Konzentration Glucobrassicinapin (4-pentenyl) bzw. Gluconasturtiin (2-phenylethyl) gemessen (Tab. 39). Zusätzlich wurden bei den Mehlen der Sorten 'Emerald', 'Akela' und 'Greenland' das GSL Progoitrin (2-hydroxy-3-butenyl) in Konzentrationen von ca. 50,0  $\mu\text{mol/g}$  nachgewiesen (Daten nicht aufgeführt). Es wandelt sich in ein instabiles ITC und spontan in 5-vinylloxazolidin-2-thione (5-Vinyl-OZT) um, für das Somolinska et al. (1997) eine fungizide Wirkung nachweisen konnten.

Ähnliche GSL-Profile wie sie in der vorliegenden Arbeit für Samen von *B. napus* ermittelt wurden, werden in diversen Studien, u.a. von Sang et al. (1984), Somolinska et al. (1997), Mazzola et al. (2001, 2007) oder Cohen et al. (2005) beschrieben. Trotz der relevanten GSL-Konzentrationen bzw. freisetzbaren ITC-Mengen zeigten die Samenmehle im Biotest keine oder nur sehr geringe Wirkungen (Tab. 41). Eine Korrelation mit dem GSL-Gehalt wurde hierbei nicht festgestellt. So wiesen jene Mehle der Sorten 'Emerald' und 'Molino', die die geringsten ITC-Mengen freisetzen konnten, im Vergleich zu den anderen Mehlen eine geringe Wirkung auf. Eine ähnliche Beobachtung machten Mazzola et al. (2001, 2007) und Cohen et al. (2005), die mit Mehlen von *B. napus* und Aufwandmengen von 0,1 bzw. 0,5 Vol. % den Befall von Apfelbäumen mit *Rhizoctonia* deutlich verringern konnten. Sie machen hierfür aber keine GSL-abhängige Biofumigationswirkung verantwortlich, sondern andere Mechanismen, insbesondere Änderungen in der antagonistischen Mikroflora des Bodens. Vor diesem Hintergrund erscheinen Samenmehle von *B. napus* zur Bekämpfung von *Verticillium* eher ungeeignet.

### **Abschließende Beurteilung**

Die toxikologischen Untersuchungen zeigen, dass in natürlichen Böden in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften Konzentrationen aliphatischer ITC mit geringem Molgewicht, wie z. B. methyl- oder 2-propenyl-ITC, von 150,0 nmol/g Boden und deutlich mehr (bis ca. 500,0 nmol/g) erforderlich sind, um eine ausreichende Wirkung gegenüber den Mikrosklerotien von *Verticillium* zu erzielen. Wird ein ITC-bildendes synthetisches Bodenentseuchungsmittel, wie z.B. Basamid Granulat, eingesetzt, werden in Abhängigkeit der Aufwandmenge ITC-Konzentrationen von 500,0-1000,0 nmol/g Boden freigesetzt (Abb. 19). Dies erklärt, warum solche Behandlungen bisher sehr wirksam gewesen sind. Für eine klassische Biofumigationsmaßnahme erscheinen Sorten von *B. juncea* derzeit am geeignetsten, weil die Grünmassen größere Mengen des toxischen 2-propenyl-ITC freisetzen können. Geht man von durchschnittlichen Sinigrin-Gehalten und Biomasseerträgen aus, können potentielle ITC-Konzentrationen von 100,0-150,0 µmol/g Boden erzielt werden. Aufgrund der nicht vollständigen Zerkleinerung des Gewebes unter praktischen Feldbedingungen muss aber mit ITC-Freisetzungsraten < 50 % gerechnet werden. Hinzu kommen suboptimale Bodenbedingungen sowie ITC-Verluste durch Verflüchtigung, die Freisetzungsraten bzw. Verweildauer der ITC im Boden mindern. Deshalb sind mit hoher Wahrscheinlichkeit reale ITC-Konzentrationen < 50,0 nmol/g Boden zu erwarten, die für eine signifikante Wirkung nicht ausreichen. Werden Samenmehle von *B. juncea* mit durchschnittlichen Sinigrin-Gehalten von 100,0 µmol/g ausgebracht, können bei Aufwandmengen von 2,5-10,0 t/ha und einer Freisetzungsraten von 80,0 % ITC-Konzentrationen von ca. 150-500 nmol/g Boden und entsprechende Wirkungen gegenüber *Verticillium* erzielt werden, die durch Folienabdeckung noch gesteigert werden können. Die ökonomische Bewertung eines solchen alternativen Biofumigationsverfahrens steht allerdings noch aus.

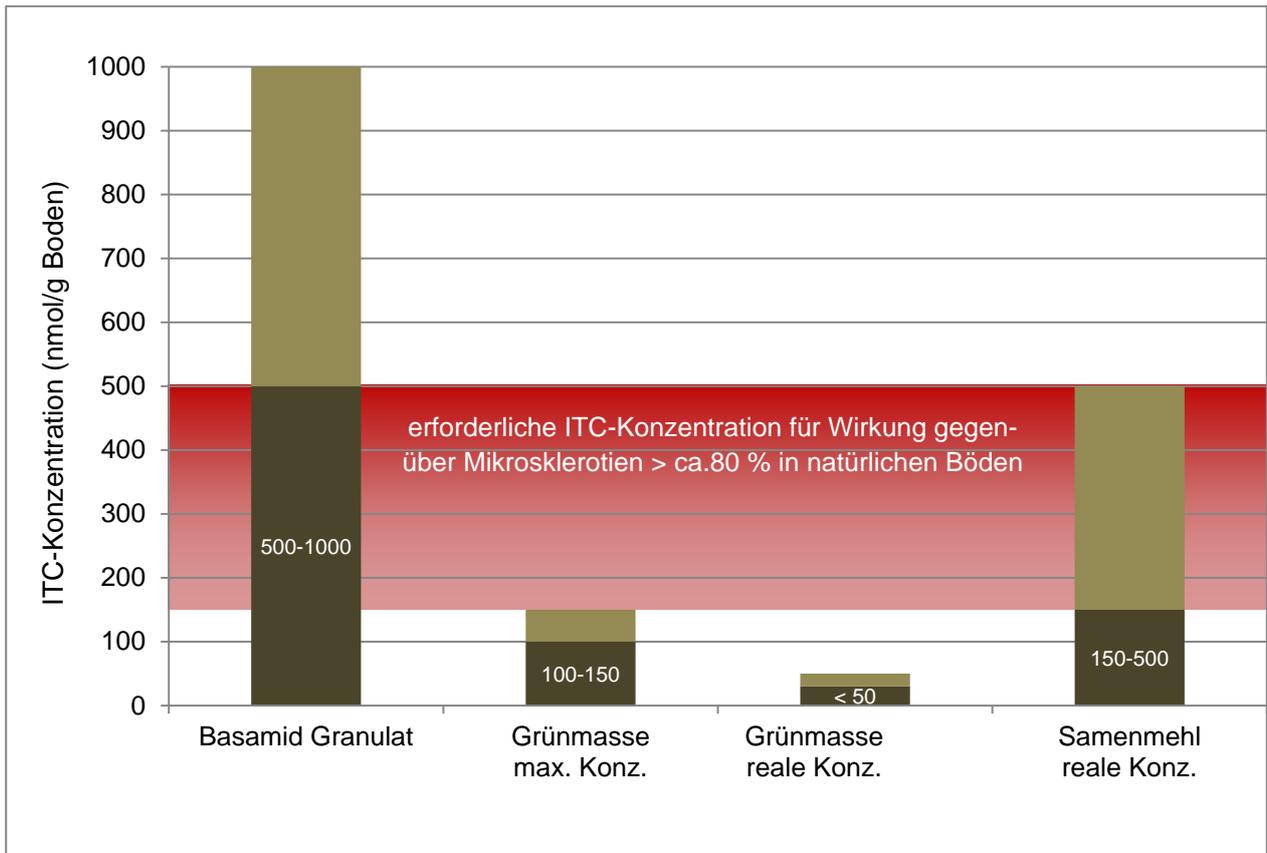


Abb. 19: Durchschnittlich freisetzbare ITC-Mengen von Grünmassen oder Samenmehlen von *B. juncea* im Vergleich zur Anwendung eines synthetischen Mittels und den für eine umfangreiche Wirkung erforderlichen ITC-Konzentrationsbereich

## 5. Zusammenfassung

Ziel des Vorhabens war es, einem systematischen umfassenden Ansatz folgend, das theoretische Biofumigationspotential (potentielle Wirkung) sowie das unter praktischen Bedingungen zu erwartende reale Wirkungspotential (aktuelle Wirkung) der Grünmassen sowie Samenmehle verschiedener Genotypen von Brassicaceae gegenüber dem Erreger *Verticillium* zu evaluieren. Die Ergebnisse sollten sowohl die Grundlage für eine zielgerichtete Implementierung der Biofumigation in praktische Anbausysteme liefern als auch die Basis für eine Optimierung und Weiterentwicklung des Verfahrens bilden.

1. Mittels eines standardisierten Testsystems wurde in einem sterilen Sand die Toxizität verschiedener relevanter ITC gegenüber den Mikrosklerotien des Erregers untersucht. Für die aliphatischen methyl- und 2-propenyl-ITC wurden LD<sub>90</sub>-Werte von ca. 90,0 nmol/g Sand ermittelt. Aromatische ITC, wie z. B. benzyl-ITC mit einem LD<sub>90</sub>-Wert von 8,4 nmol/g Sand, waren um ein vielfaches toxischer. In natürlichen Böden war die Toxizität von 2-propenyl-ITC deutlich verringert. Es konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen ITC-Wirkung und C<sub>org</sub>-Gehalt der Böden ermittelt werden. In den meisten Böden scheinen in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften ITC-Konzentrationen von 150,0 nmol/g Boden und weitaus mehr notwendig, um eine ausreichende Wirkung (> 80,0 %) gegenüber *Verticillium* zu erzielen.

2. Mittels HPLC-Analyse wurden die GSL-Gehalte der Grünmassen (Blätter, Triebe) von 27 Sorten von *B. juncea*, *B. carinata*, *B. nigra*, *S. alba*, *R. sativus* und *E. sativa* bestimmt. Zusammen mit den Biomasseerträgen konnte die maximal freisetzbare Menge an ITC in nmol/g Boden für eine Einarbeitungstiefe von 10 cm errechnet werden. In Relation zu den LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werten der jeweiligen ITC wurde das theoretische Biofumigationspotential der Biomassen ermittelt. Für alle Sorten konnte ein mittleres (50,0-90,0 % Wirkung) oder hohes Potential (> 90,0 %) geschätzt werden.

3. Um das reale Biofumigationspotential verschiedener Arten bzw. Sorten unter standardisierten Bedingungen vergleichend zu evaluieren, wurde ein effizienter Laborbiotest entwickelt. Im Hinblick auf die Biofumigationswirkung waren die Bedingungen zunächst optimiert. Die Applikation von gefriergetrockneter Grünmasse, sowie ideale Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen stellten eine möglichst vollständige Umwandlung der GSL in ITC sicher. Die Verwendung eines künstlich mit Mikrosklerotien verseuchten sterilen Quarzsandes ohne beeinflussende Bodenfaktoren in gasdicht verschlossenen Gefäßen maximierte die Verweildauer der ITC im Boden.

4. Unter den idealisierten Bedingungen des Biotestes reduzierten die Grünmassen von *B. juncea* die Anzahl keimfähiger Mikrosklerotien um 70,0-80,0 %. Die Gehalte der Grünmassen mit dem GSL Sinigrin (10,6-34,4 µmol/g) sowie die Schätzung der freigesetzten Menge 2-propenyl-ITC deuten darauf hin, dass die Wirkung ein deutlich ITC-bezogener Biofumigationseffekt war.

5. Die Grünmassen der Sorten von *R. sativus* und *S. alba* waren im Biotest mit Wirkungsgraden zwischen 9,9-37,5 % deutlich weniger effektiv. Bei *R. sativus* kann dies auf die zu geringen GSL-Gehalte oder eine ungenügende Umwandlung der GSL in ITC zurückgeführt werden. Die Gewebe einiger Sorten von *S. alba* wiesen Gehalte des GSL Tropaeolin auf (0,9-2,6  $\mu\text{mol/g}$ ), die ausreichende Mengen des hochtoxischen benzyl-ITC freisetzen konnten, um eine Wirkung zu entfalten. Die sehr geringe Wirkung dieser Grünmassen kann auf eine unmittelbare Bindung des benzyl-ITC an organische Verbindungen der sie freisetzbaren Biomasse zurückgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ermittlung des theoretischen Biofumigationspotentials keine realistische Bewertung hinsichtlich einer Wirkung unter Praxisbedingungen liefert.

6. Als aussichtsreich erwiesen sich im Biotest lediglich die Sinigrin-haltigen Grünmassen von *B. juncea*. Wurde der Biotest mit natürlichen Böden durchgeführt, war aber ihre Wirkung in Abhängigkeit der Bodeneigenschaften wiederum erheblich reduziert. Unter Praxisbedingungen muss aufgrund des unzureichenden Zerkleinerungsgrad der Biomasse und der geringen ITC-Freisetzungsraten mit ITC-Mengen  $< 50,0 \text{ nmol/g}$  Boden gerechnet werden, die keine ausreichende Wirkung mehr entfalten können. Diese Annahme wurde durch Freilandversuche bestätigt. Der Anbau von *B. juncea* an zwei verschiedenen Standorten sowie die Zerkleinerung und Einarbeitung der Biomassen hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Erreger.

7. Als Alternative zu den Grünmassen wurde das Biofumigationspotential der Samenmehle von 23 Sorten der Pflanzenarten *B. juncea*, *B. carinata*, *B. nigra*, *E. sativa*, *S. alba*, *R. sativus* und *B. napus* evaluiert. Es wurde zunächst ihr GSL-Profil analysiert. Die Mehle von *B. juncea*, *B. carinata* und *B. nigra* enthielten die GSL-Hauptkomponente Sinigrin in höchsten Konzentrationen von ca.  $100,0 \mu\text{mol/g}$ . Mittels spektralphotometrischer Analysen wurde festgestellt, dass die Samenmehle unter optimalen Bedingungen sortenabhängig maximal 62,5-100,0 % des Sinigrins in 2-propenyl-ITC umwandeln.

8. Die Wirkung der Samenmehle gegenüber *Verticillium* wurde mittels des Laborbiotests geprüft. Insbesondere bei Anwendung der Mehle von *B. juncea* mit einer Aufwandmenge von 0,4 Vol.-% konnten im sterilen Quarzsand keine keimfähigen Mikrosklerotien mehr nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Sinigrin-Gehalte und der Freisetzungsraten werden ca. 90,0 % der Wirkung als ein ITC-bezogener Biofumigationseffekt interpretiert. Zusätzlich konnte für Samenmehle von *B. juncea* ein geringer Nicht-GSL-abhängiger Wirkungseffekt nachgewiesen werden.

9. Für ein Samenmehl von *B. juncea* wurde gezeigt, dass die Biofumigationswirkung in einem natürlichen Boden in Abhängigkeit seiner Eigenschaften erheblich verringert ist. Im Laborbiotest wurde in Dosis-Wirkungs-Versuchen für den sterilen Quarzsand ein  $\text{ED}_{90}$ -Wert von 0,11 Vol.-% bestimmt. Für sechs natürliche Böden wurden dagegen  $\text{ED}_{90}$ -Werte von 0,51 - 2,21 Vol. % ermittelt. Dies entspricht Samenmehlaufwandmengen von 2,5-11,0 t/ha. In zwei Praxisversuchen mit *B. juncea*-Samenmehlen

wurden ab einer Aufwandmenge von 2,5 bzw. 5,0 t/ha Wirkungen gegenüber *Verticillium* erzielt. Sowohl im Labor- als auch Freilandversuch war die Wirkung eines *B. juncea*-Samenmehls durch Abdeckung nach der Applikation signifikant erhöht.

10. Unter den Nicht-Sinigrin-haltigen Mehlen wird die vollständige Wirkung eines Samenmehls von *E. sativa* weitgehend auf den GSL-Gehalt bzw. die freisetzbaren ITC-Mengen zurückgeführt. Die Mehle von *R. sativus* wiesen trotz sehr niedriger GSL-Gehalte Wirkungsgrade zwischen 67,0-88,0 % auf. Hier muss ein noch unbekannter, Nicht-GSL-abhängiger Wirkungsmechanismus angenommen werden. Die Samenmehle von *S. alba* und *B. napus* erwiesen sich aufgrund zu geringer wirksamer GSL-Gehalte bzw. freigesetzter ITC-Mengen als weitgehend wirkungslos.

11. Die Studie zeigt erstmalig, dass die Grünmassen GSL-haltiger Pflanzen unter Praxisbedingungen nicht jene wirksamen ITC-Mengen in einem natürlichen Boden freisetzen können, die in Abhängigkeit seiner Eigenschaften notwendig sind, um eine ausreichende Wirkung gegenüber den Mikrosklerotien (> 80,0 %) zu erzielen. Mit der Ausbringung Sinigrin-haltiger Samenmehle erscheint dies durch Erhöhung der Aufwandmenge ggf. in Kombination mit einer Folienabdeckung allerdings möglich. Zukünftig gilt es zu klären, inwieweit die Herstellung entsprechender Samenmehlmengen und ihre Ausbringung sowohl für den Produzenten als auch den Anwender ökonomisch tragfähig sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Askew, M. F., 2004: Economic Aspects of biofumigation in EU. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ? Agroindustria, 3, 229-231.
- Bellostas, N. Sorensen, J. C., Sorensen, H., 2004: Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycle. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, Agroindustria, 3, 267-272.
- Bending, D. D., Lincoln, S. D., 1999: Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. Soil Biol. Biochem., 31, 695-703.
- Borek, V., Morra, M.J., Brown, P.D., McCaffrey, J.P., 1994: Allelochemicals produced during sinigrin decomposition in soil. J. Agric. Food Chem., 42, 1030-1034.
- Borek V., Morra, M. J., Brown, P. D., McCaffrey, J. P., 1995: Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allyl nitrile in soil. J. Agric. Food Chem., 43, 1935-1940.
- Borek, V., Morra, M.J., 2005: Ionic thiocyanate (SCN-) production from 4-hydroxybenzyl glucosinolate contained in *Sinapis alba* seed meal. J. Agric. Food Chem., 53, 8650-8654.
- Brown, P. D., Morra, M. J., Mccaffrey, J. P., Auld, D. L., Williams, L., 1991: Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. Journal of chemical ecology, 17, 2021-2034.
- Brown, P. D., Morra, M. J., 1997: Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. Advances in Agronomy, 61, 167-231.
- Brown, J., Morra, M. J., 2005: Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests. Subcontract Report NREL/SR-510-35254. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
- Cohen, M. F., Yamasaki, H., Mazzola, M.J., 2005: *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. Soil Biology & Biochemistry, 37, 1215-1227.
- Collins, H. P., Alva, A., Boydston, R. A., Cochran, R. L., Hamm, P. B., Mcguire, A., Riga, E., 2006: Soil microbial, fungal, and nematode responses to soil fumigation and cover crops under potato production. Biol. Fertil. Soils, 42, 247-257.
- Curto, G., Dallavalle, E., Lazzeri, L., 2004: Preliminary study on effectiveness of Brassicaceae dehydrated tissues and seed meals in the control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, Agroindustria, 3, 317-320.
- D'Avino, L., Gaggi, C., Leoni, O., Cinti, S., Lazzeri, L., 2004: Effects of biofumigation with allyl Isothiocyanate producing plants on soil biological quality: environmental fate, ecotoxicology and evaluations via QBS Index. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, Agroindustria, 3, 381-384.
- Daugovish, O., Downer, J., Becker, O., Browne, G., Dunniway, J., 2004: Mustard-derived Biofumigation for vegetable crops and strawberries. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, Agroindustria, 3, 335-338.
- Elberson, L. R., Borek, V., McCaffrey, J. P., Morra, M. J., 1996: Toxicity of rapeseed meal-amended soil to wireworms, *Limonius californicus* (Coleoptera: Elateridae). J. Agric. Entot. vol., 13(4), 323-330.
- Finney, D. J., 1971: Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Furlan, L., Bonetto, C., Finotto, A., Lazzeri, L., Malaguti, L., Patalano, G., Parker, W. (2010): The efficacy of biofumigant meals and plants to control wireworm populations. Industrial Crops and Products, 31, 245-254.

- Galletti, S., Sala, E., Leoni, O., Burzi, P.L., Cerato, C., 2008: *Trichoderma* spp. tolerance to Brassica carinata seed meal for a combined use in Biofumigation. *Biol Control*, 45, 319-327.
- Gimsing, A. L., Kirkegaard, J. A., 2006: Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2255-2264.
- Gimsing, A. L., Kirkegaard, J. A., 2009: Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochem Rev* 8, 299-310.
- Gimsing, A. L., Strobel, B. W., Hansen, H. C .B., 2009: Degradation and sorption of 2-propenyl and benzylisothiocyanate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 1178-1184.
- Hansson, D., Morra, M. J., Borek, V., Snyder, A.J., Johnson-Maynard, J. L., Thill, D. C., 2008: Ionic Thiocyanate (SCN-) production, fate, and phytotoxicity in soil amended with Brassicaceae seed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3912-3917.
- Henderson, D., Riga, E., Ramirez, R. A., Wilson, J., Snyder, W. E., 2009: Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema* spp. nematodes in the soil. *Biological Control*, 48, 316-322.
- Kirkegaard, J. A., Sarwar, M., 1998: Biofumigation potential of brassicas. I Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil*, 201, 71-89.
- Kirkegaard, J. A., Morra, M. J., 2002: Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissue. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1683-1690.
- Kirkegaard, J. A., Matthiesen, J., 2004: Developing and refining the biofumigation concept. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, *Agroindustria*, 3, 233-239.
- Lazzeri, L., Mancini, L. M., 2000: The Glucosinolate-Myrosinase system: A natural and practical tool for biofumigation. Proc. IS chemical and non-chemical soil and substrate disinfections, Eds. Gullino, M. L., Katan, J., Matta, A., *Acta Hort.*, 532, ISHS 2000, 89-95.
- Lazzeri, L., Manici, L. M., Leoni, O., Palmieri, S., 2000: Soil-borne phytopathogenic fungi control by *Cleome hassleriana*. Proc. XXV IHC - Part 3, *Acta Hort.*, 513, ISHS 2000.
- Lazzeri, L., Leoni, O., Bernardi, R., Malaguti, L., Cinti, S., 2004: Plants, techniques and products for optimizing Biofumigation. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, *Agroindustria*, 3, 281-286.
- Leoni, O., Bernardi, R., Cinti, S., Malaguti, L., Lazzeri, L., 2004: Glucosinolate degradation products in soil. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, *Agroindustria*, 3, 359-361.
- Lopez-Medina, J., Lopez-Aranda, J. M., Medina, J. J., Miranda, L., Flores, F., 2003: Chemical and non-chemical alternatives to methyl bromide fumigation of soil for strawberry production. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78, 597-604.
- Manici, L. M., Lazzeri, L., Palmieri, S., 1997: In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2768-2773.
- Mazzola M., Granatstein D. M., Elfving D. C., Mullinix K., 2001: Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology*, 91, 673-679.
- Mazzola, M., Brown J., Izzo, A. D., Cohen, M. F., 2007: Mechanism of action and efficacy of seed meal-induced pathogen suppression differ in a Brassicaceae species and time-dependent manner. *Phytopathology*, 97, 454-460.
- Mazzola, M., Zhao, X., 2010: *Brassica juncea* seed meal particle size influences chemistry but not soil biology-based suppression of individual agents inciting apple replant disease. *Plant soil*, 337, 313-324.
- Mol, L., van Halteren, J. M., Scholte, K., Struik, P. C., 1996: Effects of crop species, crop cultivars and isolates of *Verticillium dahliae* on the population of microsclerotia in the soil, and consequences for crop yield. *Plant Pathology*, 45, 205-214.

- Morra, M. J., Kirkegaard, J. A., 2002: Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1683-1690.
- Morra, M. J., 2004: Controlling soil-borne plant pests using glucosinolate-containing tissues. Proc. 1<sup>th</sup> IS: Biofumigation - a possible alternative to methylbromide ?, *Agroindustria*, 3, 251-255.
- Müller, C., Agerbirk, N., Olsen, C.E., Boevé, J.-L., Schaffner, U., Brakefield, P.M., 2001: Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2505-2516.
- Neubauer, C., Heitmann, B., 2011: Quantitative detection of *Verticillium dahliae* in soil as a basis for selection of planting sites in horticulture. *Journal für Kulturpflanzen*, 63, 1-8.
- Price, A. J., Charron, C. S., Saxton, A. M., Sams, C. E., 2005: Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of *Brassica juncea* tissue in different soil conditions. *Pest Manag Sci* 61:1043–1051.
- Rumberger, A., Marschner, P., 2004: Accelerated degradation of metam-sodium and dazomet in soil: characterization and consequences for pathogen control. *Functional Plant Biology*, 31, 623-631.
- Sang, J. P., Minchinton, I. R., Johnstone, P. K., Truscott, R. J. W., 1984: Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can. J. Plant Sci.*, 64, 77-93.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., 1998: Biofumigation potential of brassicas. II Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant and Soil*, 201, 91-101.
- Sarwar, M. Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W., Desmarchelier, J. M., 1998: Biofumigation potential of brassicas. III In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil*, 201, 103-112.
- Smith, B. J., Kirkegaard, J. A., 2002: In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology*, 51, 585-593.
- Smolinska, U., Morra M. J., Knudsen, G. R., Brown, P. D., 1997: Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches f.sp.pisi*. *Phytopathology*, 87, 77-82.
- Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., James, R. L., 2003: Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87, 407-412.
- Triky-Dotan, S., Austerweil, M., Steiner, B., Peretz-Alon, Y., Katan, J., Gamliel, A., 2007: Generation and Dissipation of Methyl Isothiocyanate in Soils Following Metam Sodium Fumigation: Impact on *Verticillium* Control and Potato Yield. *Plant Disease*, 91, 497-503.
- Tsrur, L., Shlevin, E., Peeeretz-Alon, I., 2005: Efficacy of metam sodium for controlling *Verticillium dahliae* prior to potato production in sandy soils. *Am. J. Potato Res.*, 82, 419-423.
- Vaughn, S. F., Palmquist, D. E., Duval, S. M., Berhow, M. A., 2006: Herbicidal activity of glucosinolate-containing seedmeals. *Weed Science*, 54, 743-748.
- Warton, B., Matthiessen, J. N., Shackleton, M. A., 2001: Glucosinolate Content and Isothiocyanate Evolution - Two Measures of the Biofumigation Potential of Plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5244-5250.
- Warton, B., Matthiessen, J. N., Shackleton, M. A., 2003: Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1123-1127.
- Zhang, Y., Cho, C. G., Posner, G. H., Talalay, P., 1992: Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry*, 100-107.









