

Glyphosate induzierte Akkumulation von Shikimisäure Eine Methode zum Nachweis einer Glyphosatebehandlung

M. PFEFFER, E. HAIN und C. LANGER

Einleitung

Glyphosate (N-[phosphonomethyl]-glycin) ist ein nicht selektives systemisch wirkendes Nachauflaufferbizid. JAWORSKI, 1972 fand als erster die Wirkung von Glyphosate auf die Biosynthese aromatischer Aminosäuren.

Erst acht Jahre später konnten AMRHEIN et al. 1980 den molekularen Wirkort aufklären.

Glyphosate hemmt die Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), ein Enzym im Shikimatweg aus dem die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sowie äußerst vielfältige Verbindungen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels hervorgehen.

EPSPS ist ein Chloroplastenenzym das Shikimat-3-phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) umsetzt.

Als einfachste und unmittelbare Konsequenz einer EPSPS-Hemmung, könnte eine Akkumulation des Substrates Shikimat-3-phosphat erwartet werden. Die Wirkung des Glyphosate in Pflanzen führt jedoch zur Akkumulation von Shikimat. Vermutlich wird Shikimat-3-phosphat durch unspezifische Phosphatasen hydrolysiert.

Diese Anreicherung von Shikimat kann als Indikation für eine Glyphosatebehandlung herangezogen werden.

Dieser methodische Ansatz ist vor allem für die Wirksamkeitsbewertung glyphosatehaltiger Herbizide von Interesse, da konventionelle visuelle Bonitierungsverfahren aufgrund der relativ langsamen Symptomausprägung nach einer Glyphosatebehandlung sehr zeitaufwendig sind.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, wie schnell nach einer Glyphosatebehandlung ein signifikanter Anstieg

Tabelle 1: Vergleich der Shikimisäurekonzentrationen der mit drei unterschiedlich formulierten Herbiziden behandelten Rapspflanzen mit der Kontrolle 5 h nach Applikation

WH	Kontrolle µg Shikimisäure / g FG	5h n. Applikation		
		Roundup µg Shikimisäure / g FG	Roundup Ultra µg Shikimisäure / g FG	Touchdown µg Shikimisäure / g FG
1	18,1	29,8	26,1	15,1
2	20,6	19,7	27,9	17,8
3	24,2	18,5	25,8	19,4
4	21,3	20,8	24,7	10,5
5	18,1	19,5	27,2	22,6
6	19,3	21,7	18,9	14,3
7	17,4	31,0	25,7	20,7
8	16,9	25,6	21,6	33,3
Mittelwert	19,5	23,3	24,7	19,2
Median	18,7	21,2	25,8	18,6
Standardabw.	2,4	4,9	3,0	6,9
Variationskoeffizient %	12,5	20,8	12,2	35,8
	-	n.s.	n.s.	n.s.

der Shikimisäurekonzentration in grünen oberirdischen Pflanzengewebe eintritt und ob unterschiedliche Herbizidformulierungen in ihrer Wirksamkeit mit dem Indikatormolekül Shikimisäure erfasst werden können.

Material und Methoden

Als Versuchspflanze wurde Raps (*Brassica napus*) herangezogen. Die Pflanzenanzucht erfolgte im Gewächshaus nach der Aussaat am 22.10.2001. Ab dem Stadium BBCH 12 (2. Laubblatt entfaltet) wurde die Raumtemperatur auf 5°C abgesenkt.

Die Herbizidapplikation erfolgte im Stadium BBCH 14 (4. Laubblatt entfaltet) mit einer Motorrückenspritze und einer Mitelaufwandmenge von 3 l/ha und einer Wasseraufwandmenge von 400 l/ha.

Es wurden die drei unterschiedlich formulierten Herbizide Roundup, Roundup Ultra und Touchdown eingesetzt.

Jede Herbizidbehandlung wurde in achtfacher Wiederholung durchgeführt. Als

Kontrolle wurden unbehandelte Pflanzen verwendet.

Die Pflanzen wurden 5 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Applikation beprobt. Je Behandlungsvariante und Zeitpunkt wurden ca. 2g Blätter mit einer Rasierklinge abgeschnitten, in Plastikbeutel verpackt und auf Eis ins Labor transportiert.

Die Blätter wurden mit flüssigen Stickstoff zerrieben. 1g Blattprobe wurde mit 4 ml 0,01 M H₂SO₄ auf einem Horizontalschüttler 1h extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt mit 1 ml 0,4 M NaHCO₃ neutralisiert und in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 25000 g zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde über eine 0,45 µm CA-Membranfilter filtriert und mittels HPLC UV-VIS Detektion vermessen. Die Chromatographie wurde mit einem HP 1090 mit DAD bei einer Messwellenlänge von 215 nm durchgeführt. Als Trennsäule diente eine HP ODS I, 5µm, 250 x 4. Der Eluent war eine 3,5 mM Phosphorsäure pH = 2,5 isokratisch, Fluß 0,5 ml/min. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 100% MeOH gespült.

Autoren: Dr. Michael PFEFFER, Dipl. Ing. Eva HAIN und Ing. Christoph LANGER, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Phytomedizin, Spargelfeldstraße 191, A-1226 WIEN



Tabelle 2: Vergleich der Shikimisäurekonzentrationen der mit drei unterschiedlich formulierten Herbiziden behandelten Rapspflanzen mit der Kontrolle 48 h nach Applikation

WH	Kontrolle	48h n. Applikation		
		Roundup µg Shikimisäure / g FG	Roundup Ultra	Touchdown
1	14,1	39,5	47,9	40,7
2	12,8	40,2	48,3	33,0
3	12,3	29,3	32,8	59,6
4	14,4	61,0	51,0	43,0
5	13,9	52,7	43,0	32,0
6	14,3	42,4	34,2	54,8
7	14,9	30,9	41,5	46,1
8	10,0	37,8	25,9	25,4
Mittelwert	13,3	41,7	40,6	41,8
Median	14,0	39,8	42,2	41,9
Standardabw.	1,6	10,6	8,8	12,6
Variationskoeffizient %	12,0	25,4	21,7	30,0
		<0,05*	<0,05*	<0,02*

Ergebnisse

In den *Tabellen 1 und 2* sind die Konzentrationen der Shikimisäure 5 bzw. 48 Stunden nach der Herbizidapplikation dargestellt.

Nach 5 Stunden konnte keine signifikante Erhöhung der Shikimisäurekonzentra-

tion in den Blättern gegenüber der Kontrolle gefunden werden. Zwischen den unterschiedlich formulierten Präparaten war ebenfalls kein Unterschied festzustellen. 48 h nach der Applikation konnte eine signifikant höhere Shikimisäurekonzentration in den mit Glyphosate behandelten Pflanzen gegenüber der Kontrolle

festgestellt werden. Allerdings war auch zu diesem Zeitpunkt keine Differenzierung zwischen den drei verwendeten Herbiziden absicherbar.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Shikimisäure ermöglicht einen raschen und sicheren Nachweis der Glyphosatewirkung.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte bereits 48h nach der Herbizidapplikation ein statistisch signifikanter Anstieg der Shikimisäure in den Rapsblättern nachgewiesen werden.

Die unterschiedlich formulierten Handelsprodukte zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Herbizidwirksamkeit.

Literatur

- JAWORSKI, EG, Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis, *J.Agr.Food Chem.*, Vol. 20, No. 6, 1195-1198, 1972.
- AMRHEIN, N., J. SCHAB und H.C. STEINRÜCKEN, The Mode of Action of the Herbicide Glyphosate, *Naturwissenschaften* 67, 356-357, 1980.