

Aus dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Optimierung von Glucosinolaten und deren Hydrolyseprodukte in
Pak Choi mittels einer variierten Stickstoff-Schwefel-Düngung sowie
einer Selenblattapplikation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
M.Sc. oec. troph. Caroline A. C. Heyer
aus Trier

Kiel, 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Herr Prof. Dr. E. Hartung

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. K. H. Mühling

2. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. K. Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2015

INHALTSVERZEICHNIS

I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
II	TABELLENVERZEICHNIS	9
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1	EINLEITUNG	1
1.1	Hintergrund einer Anreicherung gesundheitsfördernder Pflanzen-inhaltsstoffe	1
1.2	Bedeutung der Nährstoffe Stickstoff, Schwefel und Selen auf Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte	1
1.3	Glucosinolate – sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in <i>Brassicaceae</i>	5
1.3.1	Pflanzliche Glucosinolatquellen	5
1.3.2	Chemische Struktur der Glucosinolate	5
1.3.3	Glucosinolatbiosynthese in Nutzpflanzen	6
1.3.4	Lokalisation und Transport der Glucosinolate in der Pflanze	7
1.4	Glucosinolat-Hydrolyseprodukte – Abbauprodukte mit humanem Nutzen.....	7
1.4.1	Biosynthese der Hydrolyseprodukte.....	7
1.4.2	Pflanzenphysiologische Funktionen der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte.....	9
1.4.3	Wirkung der GLS-HP auf antioxidative Prozesse und Krebs.....	10
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Material- und Chemikalienliste	13
3.2	Versuchsteil 1: Einfluss einer variierten Stickstoff- und Schwefel-Düngung auf Glucosinolate und Hydrolyseprodukte in Pak Choi	15
3.3	Versuchsteil 2: Auswirkungen einer Selenblattapplikation auf die Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte in Pak Choi	16
3.4	Die analytische Parametererfassung.....	17
3.4.1	Bestimmung von Frisch-, Trockenmasse und Gesundheitsstatus.....	17
3.4.2	Elementaranalyse zur Stickstoff- und Schwefelbestimmung	17
3.4.3	Analytische Sulfat- und Nitratbestimmung mittels IC	18
3.4.4	Identifizierung und Quantifizierung der GLS mittels HPLC.....	18

3.4.5	Analytische Erfassung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte.....	19
3.4.6	Analyse der Selenkonzentration im Pflanzenmaterial.....	20
3.4.7	Statistische Datenauswertung	20
4	VERSUCHSERGEBNISSE.....	22
4.1	Ergebnisse einer variierten N- und S- Düngung auf einzelne Parameter in Pak Choi mit Fokus auf GLS und GLS-HP	22
4.1.1	Einfluss der variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Frisch-, Trockenmasse und allgemeines Befinden der Pflanze	22
4.1.2	Ergebnisse der N- und S-Düngung auf Stickstoff, Schwefel sowie das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis	25
4.1.3	Ergebnisse der variierten N- und S-Düngung auf Nitrat- und Sulfatgehalt.....	26
4.1.4	Ergebnisse der Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Konzentration und Muster der Glucosinolate in Pak Choi	26
4.1.5	Ergebnisse einer variierten Stickstoff- und Schwefel-Düngung auf Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Pak Choi.....	31
4.2	Ergebnisse des Selen-Experimentes: Auswirkungen einer Selen-Blattapplikation auf einzelne Parameter in Pak Choi	35
4.2.1	Frisch- und Trockenmasse in Pak Choi infolge einer Selenblattapplikation unterschiedlicher Konzentrationen.....	35
4.2.2	Ergebnisse einer Se-Blattapplikation auf in Pak Choi analysiertem Stickstoff, Schwefel, Stickstoff/Schwefel-Verhältnis und Selen.....	36
4.2.3	Detektierte Glucosinolate in Selen-blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen.....	37
4.2.4	Detektierte Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in mit Selen-blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen.....	39
5	DISKUSSION.....	41
5.1	Effekt variierten N- und S-Düngung auf diverse Parameter in Pak Choi mit besonderem Fokus auf GLS und GLS-HP	41
5.1.1	Beeinflussung von Frischmasse, Trockenmasse und Ernährungsstatus der Pflanze infolge der variierten N- und S-Düngung in Pak Choi	41
5.1.2	Auswirkung einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die N und S-Konzentration sowie das N/S-Verhältnis in Pak Choi.....	43
5.1.3	Einfluss einer variierten Schwefel und Stickstoffdüngung auf die Nitrat- und Sulfat-Konzentration in Pak Choi	46
5.1.4	Auswirkung der variierten Schwefel und Stickstoff-Düngung auf in Pak Choi detektierte Glucosinolate	49
5.1.5	Auswirkung der Schwefel- und Stickstoff-Düngung auf aliphatische, aromatische und indolische Glucosinolate.....	52
5.1.6	Effekte einer variierten Schwefel- und Stickstoff-Düngung auf Konzentration und Muster der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte	56
5.2	Auswirkung der Se-Blattapplikation auf in Pak Choi erfasste Parameter mit besonderem Fokus auf GLS und GLS-HP	61
5.2.1	Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf Frisch- und Trockenmasse.....	61

5.2.2	Einfluss der Selen-Applikation auf S-, N-und Se-Gehalt in Pak Choi	61
5.2.3	Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf die in Pak Choi erfasste Konzentration und Muster der Glucosinolate.....	63
5.2.4	Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf Konzentration und Muster der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Pak Choi.....	68
5.2.5	Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf die in Isothiocyanate, Nitrile und Epithionitrile klassifizierten Hydrolyseprodukte in Pak Choi.....	70
5.3	Anreicherung von GLS und GLS-HP durch eine Stickstoff- und Schwefeldüngung bzw. Selenblattapplikation: Eine Bewertung der Metabolitsteuerung aus gesundheitsfördernder Sicht.....	73
6	FAZIT	75
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
8	SUMMARY	77
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
IV	ANHANG	XIV

I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 2-1: Darstellung des S- bzw. Se-Metabolismus. S bzw. Se wird als Sulfat (SO_4^{2-}) bzw. Selenat (SeO_4^{2-}) aufgenommen. Durch ATP-Sulfurylase (1) entsteht Adenosinphosphosul-fat (APS) bzw. -selenat (APSe). Durch Reaktion mit APS-Reduktase (4) entsteht Sulfit (SO_3^{2-}) bzw. Selenit (SeO_3^{2-}). Mittels APS-Sulfotransferase (2) entsteht Phospho-APS (PAPS), welches mit PAPS-Sulfotransferase (3) zu Sulfateestern oder SO_3^{2-} reagiert. SO_3^{2-} reagiert mit Sulfitreduktase (5) und Ferredoxin (Fd) zu Sulfid (S^{2-}). SeO_3^{2-} wird durch reduziertes Glutathion (8) zu Selenotrisulfid (GSSeSG), zu Selenoglutathion (GSSeSH) und zu Selenid (Se^{2-}) reduziert. S^{2-} und Se^{2-} reagieren mit O-Acetylserin-(thiol)lyase (6) zu Cystein bzw. SeCystein, die durch (7) Sulfhydryltransfer den Einbau in Metabolite oder Methionin ermöglichen. Zudem ist Se in Form von Dimethyl-Se flüchtig. Se-akkumulierende Pflanzen (akk.) metabolisieren Se-methylcystein 4
- Abb. 2-2: Schematisierte Darstellung der Glucosinolat-Grundstruktur, sowie Glucosinolaten aliphatischen, aromatischen und indolischen Ursprunges 6
- Abb. 2-3: Darstellung der Glucosinolat-Hydrolyse. Während der Glucosinolat-Hydrolyse mittels Myrosinase entsteht Thiohydroximat. In Abhängigkeit von pH-Wert, Fe^{2+} , Epithiospezifisches Protein (ESP), Thiocyanat-formendes-Protein (TFP) oder ungesättigte Seitenkette werden Isothiocyanate (ITC), Nitrile, Epithionitrile oder Thiocyanate hydrolysiert. Instabile ITC mit einer OH-Seitenkette hydratisieren zu Oxazolidinthione oder zu Indolylmethyl-ITC, die zu Indol-3-Carbinol (I3C) oder mit Ascorbinsäure (AsA) zu Ascorbigen metabolisieren. 9
- Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Karzinomentstehung und Einwirkung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte. Die Einflussnahme geschieht durch Induktion der Phase I-Enzyme (1), Inhibierung der Phase I-Enzyme (2), Induktion der Phase II-Enzyme (3) und Hemmung der Tumorpromotion (4) 11
- Abb. 5-1: Entwicklung der Biomasse mittels variiertes Stickstoff- und Schwefeldüngung in Pak Choi. 23
- Abb. 5-2: Ausbildung der Symptome in Form von Chlorosen, Nekrosen im intercostalen Bereich und einer Anthocyanfärbung älterer Pak Choi-Blätter unter S-Mangel und 1,5 g N/Gefäß. 23
- Abb. 5-3: Effekt einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Frisch- (A) und Trockenmasse (B) in Pak Choi. 24
- Abb. 5-4: Auswirkung einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Stickstoff- (A) und Schwefel- (B) Konzentration sowie das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (C) in Pak Choi. 25
- Abb. 5-5: Effekt der variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Nitrat- (A) und Sulfat- (B) Konzentration. 26

Abb. 5-6: Auswirkungen einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die Gesamtkonzentration der Glucosinolate (A) und deren Einteilung in aliphatisch (B), aromatisch (C) und indolisch (D).	29
Abb. 5-7: Effekt der Stickstoff- und Schwefeldüngung auf individuelle Glucosinolate in Pak Choi.	30
Abb. 5-9: Auswirkungen einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die Gesamtkonzentration der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte (A) und deren Einteilung in Isothiocyanate (B), Nitrile (C) und Epithionitrile (D).	33
Abb. 5-10: Einfluss einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf das Isothiocyanat/Nitril- (A) sowie Isothiocyanat/Epithionitril-Verhältnis	33
Abb. 5-11: Individuelle Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in mit Stickstoff und Schwefel gedüngten Pak Choi Pflanzen.	34
Abb. 5-12: Entwicklung der Frischmasse (A) und Trockenmasse (B) mittels einer gesteigerten Selen-Konzentration über Blattapplikation in Pak Choi.	35
Abb. 5-13: Stickstoff (A), Schwefel (B), das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (C) und Selen (D) in mit unterschiedlichen Se-Konzentrationen behandelten Pak Choi-Pflanzen.	36
Abb. 5-14: Beeinflussung der Se-Blattapplikation (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze) auf Gesamtgehalt (A), aliphatische (B), aromatische (C) und indolische (D) Glucosinolate.	37
Abb. 5-15: Einfluss einer Se-Blattapplikation in verschiedenen Konzentrationen (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze) auf die individuellen Glucosinolate in Pak Choi.	38
Abb. 5-16: Gesamtkonzentration (A) und Klassifizierung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Isothiocyanate (ITC) (B) und Epithionitrile (Epi) (C) und ITC/Epi-Verhältnis (D) in mit Selen über Blattapplikation behandelten Pak Choi Pflanzen.	40
Abb. 5-17: Individuelle Glucosinolat-Hydrolyseprodukte detektiert in mit Selen blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen.	40
Abb. 9-1: Darstellung der chemischen Struktur der variablen Seitenkette von Glucosinolaten, klassifiziert in aliphatisch mit der Unterklasse der Alkylthioalykle (S-haltig) und Olefine (mit Doppelbindung, mit OH-Gruppe), aromatisch und indolisch.	XIV
Abb. 9-2: Schematische Darstellung der Stickstoffaufnahme und -assimilation in der Pflanze. Nitrat wird im Symport in die Wurzelzelle aufgenommen, dort entweder in der Vakuole abgespeichert, enzymatisch im Leukoplasten zu Amide metabolisiert oder direkt über das Xylem ins Blatt transportiert. Dort wird es ebenfalls in der Vakuole gespeichert oder im Chloroplasten enzymatisch daraus AS synthetisiert, welche in den sekundären Metabolitsynthese einfließen.	XV
Abb. 9-3: Vermuteter Mechanismus der Epithionitril- und Nitril-Synthese mithilfe von Eisen (Fe ²⁺) und Epithiospezifischen Proteins (ESP).	XVI

- Abb. 9-4: Mechanismus der enzymatischen Glucose-Abspaltung mittels der Carboxylgruppe eines in Myrosinase enthaltenen Glutaminsäure-Restes (Glu 409) (modifiziert nach Bones and Rossiter, 2006).XVI
- Abb. 9-5: Konzentration der GLS-HP in einem S-Steigerungsvorversuch mit *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* Yuki. 27
- Abb. 9-6: Graphische Darstellung in Form von Vektorgraphiken zur Interpretation von phenotypischen Variationen auf die Konzentration von Inhaltsstoffen (nach Koricheva, 1999). 27
- Abb. 9-7: Vektorgraphische Darstellung des Düngungseffektes auf die Konzentration der GLS-Gesamtkonzentration in Frischmasse von Pak Choi (nach Koricheva, 1999). Mit konstanter S- und variierter N-Düngung erfolgte eine reduzierte GLS-Synthese, insbesondere unter S-Mangelbedingungen kam es zu einem Verdünnungseffekt (A). Mit konstanter N- und variierter S-Düngung kam es zu einer deutlich erhöhten Synthese der GLS (B) ohne Auftreten eines Verdünnungseffektes. 28
- Abb. 9-8: Vektorgraphische Darstellung des Düngungseffektes auf die Konzentration der GLS-HP-Gesamtkonzentration in Frischmasse von Pak Choi (nach Koricheva, 1999). Mit konstanter N- und variierter S-Düngung erfolgte eine erhöhte Synthese der GLS-HP (A), während mit variierter N und konstanter S-Düngung ein reduzierte Synthese detektiert wurde (B). In beiden Fällen trat kein Verdünnungseffekt auf. 28
- Abb. 9-9: Darstellung der Konzentrationsentwicklung der GLS mit applizierter Se-Dosis (Se₀ = 0, Se₁ = 0,5, Se₃ = 2, Se₃ = 20 und Se₄ = 30 mg Se/Pflanze) in Pak Choi. Jegliche Düngungseffekte sind aufgrund der nicht vorliegenden Signifikanz auszuschließen. 29
- Abb. 9-10: Darstellung der Konzentrationsentwicklung der GLS-HP mit über das Blatt applizierte Se-Konzentrationen (Se₀ = 0, Se₁ = 0,5, Se₃ = 2, Se₃ = 20 und Se₄ = 30 mg Se/Pflanze) in Pak Choi. Mit zunehmender Se-Konzentration bis 2 mg/Pflanze erfolgte eine erhöhte Synthese der GLS-HP, während mit weiter ansteigender Se-Konzentration die Synthese wieder reduziert wurde. Ein Verdünnungseffekt fand nicht statt. 29

II TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4-1: Liste der verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien	13
Tab. 4-2: Konzentration der applizierten Schwefel- und Stickstoff-Düngung.....	15
Tab. 4-3: Konzentration der über das Blatt applizierten Selenlösung.....	17
Tab. 5-1: SPAD-Werte aus Versuch V1.2. abhängig von Stickstoff-, Schwefeldüngung und der Blattfraktion.....	24
Tab. 5-2: In Pak Choi detektierte Glucosinolate	27
Tab. 9-1: Retentionszeit (Rt) und Responsefaktor (Rf) der Glucosinolate in mit N- und S- gedüngten Pak Choi-Pflanzen.	XVII
Tab. 9-2: Versuchsplan der drei N und S-Versuche V1.1., V1.2. und V1.3.	18
Tab. 9-3: Zusammensetzung der Nährlösung für den Selen-Versuch.....	19
Tab. 9-4: Plan und Durchführung des Selen-Versuches V2.1.a und b.	19
Tab. 9-5: Bonitierung der Pak Choi-Pflanzen in V1.1. und V1.2.	21
Tab. 9-6: SPAD-Werte der mit variiertem Stickstoff- und Schwefelkonzentration behandelten Pak Choi Pflanzen im Wachstumsverlauf (Versuch V1.3).	23
Tab. 9-7: Konzentration der Makronährstoffe, Nitrat, Sulfat, Frischmasse, Trockenmasse und GLS in Versuch V1.1. (A), V1.2. (B) und V1.3. (C).	23
Tab. 9-8: Nährstoffgehalte des in V1.1. verwendeten Bodens (Ostenfeld) nach Laboranalyse	25
Tab. 9-9: Konzentration aller während der IC-Messung analysierten Parameter in jungem und altem Blattmaterial von Pak Choi.....	25
Tab. 9-10: Gesamtkonzentration und individuelle GLS-HP sowie ITC, Nitrile und Epithionitrile und deren Verhältnis zueinander in mit N und S behandelten Pak Choi-Pflanzen (Versuch V1.3.).	26
Tab. 9-11: Detektierte Parameter in V1.1. nach Fraktionierung des Pflanzenmaterials in Jung, Alt, Blattstiel und -spreite.	30
Tab. 9-12: Signifikanz der ermittelten Parameter (N-, S- und interaktiver N:S-Effekt) in Versuch V1.3.	31
Tab. 9-13: Umrechnung der in V1.3. detektierten GLS in $\mu\text{g/g}$ TM und $\mu\text{mol/g}$ FM in mit N und S gedüngten Pak Choi-Pflanzen.	32
Tab. 9-14: Die in Pak Choi detektierten GLS und die korrespondierenden GLS-HP.....	33
Tab. 9-15: Applizierte Mengen [ml] der Selenlösung pro Pflanze	33
Tab. 9-16: Mittelwerte der im Selen-Versuch (V2.4.) detektierten Parameter mit Angabe der statistischen Signifikanz.	34

III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2PE-CN	2-Phenylethyl-Cyanid
2PE-ITC	2-Phenylethyl-Isothiocyanat
3But	3-Butenyl
3But-ITC	3-Butenyl-Isothiocyanat
4MG	4-Methoxyglucobrassicin (4-Methoxy-3-Indolyl-methyl)
4OH	4-Hydroxyglucobrassicin (4-Hydroxy-3-Indolyl-methyl)
4Pent-CN	4-Pentenyl-Cyanid
4Pent-ITC	4-Pentenyl-Isothiocyanat
µmol/L	Mikromol pro Liter
APS	Adenosinphosphosulfat
APSe	Adenosinphosphoselenat
ARE	Antioxidative Response Element
AS	Aminosäure
AsA	Ascorbinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	ATP-Sulfurylase
bZIP	Leucin Zipper
C ₄ H ₆ BaO ₄	Bariumacetat
C ₇ H ₅ N	Benzonitril
Ca(NO ₃) ₂	Kalziumnitrat
CuSO ₄ *5H ₂ O	Kupfersulfat
CYP	Cytochrom P-450
Cys	Cystein
Epi	Epithionitril
Epi3But	Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates
Epi4Pent	Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates
ESP	Epithiospezifisches Protein
Fd	Ferredoxin
Fd _{red}	reduziertes Eisen
Fe-EDTA	EDTA-Eisen
Fe _{ox}	oxidiertes Ferredoxin
Fe _{red}	reduziertes Ferredoxin

FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
FM	Frischmasse
g	Gramm
GB	Glucobrassicin
GBC	Glucobrassicinapin
GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektroskopie
GI	Glucoiberin
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLS	Glucosinolat
GLS-HP	Glucosinolat-Hydrolyseprodukt
GNP	Gluconapin
GNI	Gluconasturtiin
GPx	Glutathionperoxidase
GRA	Glucoraphanin
GRE	Glucoraphenin
GSH	Glutathion
GSSeH	Selenglutathion
GSSeSG	Selenotrisulphid
GST	Glutathion-S-Transferase
GTL	Glucotropaeolin
GTR1	Glucosinolat-Transporter 1
GTR2	Glucosinolat-Transporter 2
H ₃ BO ₃	Borsäure
HAST	Hochaffiner Sulfattransporter
HNO ₃	Salpetersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I3C	Indol-3-Carbinol
IACN	Indol-3-Acetonitril
IC	Ionenchromatographie
IES	Indol-3-Essigsäure
ITC	Isothiocyanat
ITC/Nitril-Verhältnis	Isothiocyanat/Nitril-Verhältnis
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogensulfat
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
KCl	Kaliumchlorid

L	Liter
kg	Kilogramm
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated Protein-1</i>
Meth	Methionin
mg	Milligramm
MgSO ₂	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MnSO ₄ *H ₂ O	Mangansulfat
N/S-Verhältnis	Stickstoff/Schwefel-Verhältnis
Na ₂ SeO ₄	Natriumselenat
NADH	Nicotinamiddinukleotid
NADPH/H ⁺	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NGB	Neoglucobrassicin
NH ₃	Ammoniak
NH ₄	Ammonium
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniummolybdat
NiSO ₄ *6H ₂ O	Nickelsulfat
nmol	Nanomol
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₂ ⁻ -Reduktase	Nitrit-Reduktase
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO ₃ ⁻ -Reduktase	Nitrat-Reduktase
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2</i>
PAPS	Phospho-Adenosinphosphosulfat
PEITC	2-Phenylethyl-ITC
PRO	Progoitrin
rLF	relative Luftfeuchtigkeit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNHC(=S)-SG	GSH-Konjugat der ITC
RT	Raumtemperatur
R-SH	Thiolgruppe
S	Schwefel
S ²⁻	Sulfid
Se ²⁻	Selenid

SeCys	Selenocystein
SeGLS	Selenoglucosinolat
SeGLS-HP	Selenoglucosinolat-Hydrolyseprodukt
SeMeth-SeCys	Selenomethyl-Selenocystein
SeMeth	Selenomethionin
SeO ₃ ²⁻	Selenit
SeO ₄ ²⁻	Selenat
SGT	S-Glycosyltransferase
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom
SO ₃ ²⁻	Sulfit
SO ₄ ²⁻	Sulfat
SPAD	Soil Plant Analysis Development
TFP	Thiocyanatformin-Protein
TM	Trockenmasse

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund einer Anreicherung gesundheitsfördernder Pflanzeninhaltsstoffe

Über die Jahrzehnte hat sich die Erkenntnis etabliert, dass der Verzehr pflanzlicher Nahrungsmittel vorteilhaften Einfluss auf den Gesundheitszustand des Menschen nehmen bzw. der Krankheitsprävention und -therapie dienen kann. Unzählige Pflanzeninhaltsstoffe können unterschiedlichste Wirkungen im menschlichen Organismus auslösen (Kasper, 2004, S. 3, 101–124). Entsprechend ist es im Interesse der Gesundheitsförderung sich deren positiven Wirkung zu Nutze zu machen und im Idealfall sogar zu verbessern. Bereits im Stadium der Pflanzenzucht kann durch Düngungsmaßnahmen die Konzentration von beispielsweise Mineralstoffen, essentiellen Aminosäuren, Kohlenhydraten und funktionellen Metaboliten (z.B. Vitamine) gesteigert werden. Diese Vorgehensweise wird als *agronomische Biofortifikation* bezeichnet. Aber auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (SPI) mit bioaktivem Nutzen können in der Pflanze angereichert werden. Das Ziel ist letztendlich die Bioverfügbarkeit und deren positiven Eigenschaften im Humanstoffwechsel zu verbessern (Hirschi, 2009). Diese Art der Anreicherung kann nicht nur über eine Bodendüngung, sondern auch in Form einer Blattapplikation realisiert werden. Eine Tatsache, die für den weiteren Versuchsablauf von marginaler Bedeutung ist.

1.2 Bedeutung der Nährstoffe Stickstoff, Schwefel und Selen auf Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte

Bemerkenswerte SPI sind die Glucosinolate (GLS) und deren Hydrolyseprodukte (GLS-HP), welche überwiegend in *Brassica* vertreten sind. Angesichts ihrer gesundheitsfördernden Wirkung sind sie von zentralem Interesse (detaillierte Informationen dazu unter Kapitel 1.3). Glucosinolate sind sowohl N- als auch S-haltig. Diese beiden Makronährstoffe ähneln sich stark z.B. in Assimilation, Metabolismus und Wirkungsmechanismus. Infolgedessen kommt es in *Brassica*-Arten zu synergetischen Effekten: Ist ein Nährstoff unzureichend oder im Überfluss vorhanden, wird die Aufnahme des anderen Elements entsprechend angepasst (Rosen *et al.*, 2005). Die S-Aufnahme und -Assimilation hängt stark vom N-Bodenangebot ab und *vice versa*. Unter optimalen Bodenbedingungen und Nährstoffangebot herrscht ein N/S-Verhältnis von 20:1 (Brunold,

1990). Beide Makronährstoffe haben einen gleichermaßen großen Einfluss auf Pflanzenwachstum und Qualität und sind Hauptbestandteile von u.a. unzähligen Proteinen und SPI (*Haneklaus et al.*, 2007, S. 195).

Stickstoff und S sind sowohl Bestandteile der GLS als auch teilweise der GLS-HP, welche nach enzymatischer Hydrolyse durch Myrosinase (EC 3.2.1.147) aus den GLS entstehen. Somit steuern N und S indirekt sowohl die Konzentration als auch das Muster, d.h. die Synthese individueller GLS und GLS-HP. Bis zu 50% des Gesamt-S können an diese Metabolite binden und die Synthese steuern (*Schnug et al.*, 1995). GLS und GLS-HP können aufgrund ihres chemischen Aufbaus nicht nur alleine durch eine N- oder S-Düngung variiert werden, sondern auch durch beide Nährstoffe in Kombination (*Bloem et al.*, 2007; *Falk et al.*, 2007; *Gerendás et al.*, 2009; 2008a; *Hu et al.*, 2011; *Rosen et al.*, 2005). Zudem kann das Muster durch gezielte Synthesesteuerung individueller GLS und GLS-HP infolge des Düngungsangebotes verändert werden (*Gerendás et al.*, 2009; *Gerendás et al.*, 2008a). Während unter S-Mangel weniger GLS synthetisiert werden, steigen diese mit zunehmender S-Zufuhr beachtlich an (*Bones and Rossiter*, 2006; *Gerendás et al.*, 2008b; *Schnug et al.*, 1995). Diese Erkenntnis konnte zusätzlich in einem Feldversuch bestätigt werden (*Ahmad et al.*, 2007). Jedoch sind die Erkenntnisse zum N-Einfluss sehr widersprüchlich: Ein Überangebot resultiert S-unabhängig in einem GLS-Rückgang (*Fischer*, 1992), ein Mangel verursacht einen Anstieg der GLS und GLS-HP (*Bilsborrow et al.*, 1993; *Omirou et al.*, 2009). *Booth et al.* (1990) dokumentierten einen neutralen N-Effekt auf die beiden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Zudem werden GLS sowohl durch ein N- als auch S-Angebot gesteuert (*Gerendás et al.*, 2009). Auch weitere externe Faktoren können die GLS-Hydrolyse durch Eingreifen in die Myrosinase- (durch AsA) oder ESP-Aktivität beeinflussen (*Burmeister et al.*, 2000). Letztendlich kann die GLS-Synthese somit gezielt durch äußere Düngungsmaßnahmen gesteuert werden.

Das Spurenelement Selen (Se) ist für die Pflanze an sich nicht essentiell. Über hochaffine Sulfattransporter (HAST; z.B. AtSultr1:1 und AtSultr1:2) wird es in organischer (Se-AS, -Proteine) oder anorganischer Form [Selenit (Se^{2-}), Selenat SeO_3^{2-}] aufgenommen, wobei letzteres bevorzugt wird (*Combs Jr. and Gray*, 1998; *Seppänen et al.*, 2010). Selenat wird in der Vakuole gespeichert oder reagiert über einen längeren Reaktionsweg zu Se-Cystein (SeCys). Dieser ist der zentrale Baustein zahlreicher Se-haltiger Metabolite (*Kopsell and Kopsell*, 2007; *Terry et al.*, 2000). Pflanzen werden nach ihrer Se-Konzentration klassifiziert in nicht-Se-akkumulierend (<25 $\mu\text{g/g}$ TM), sekundär-Se-akkumulierend (25-1.000 $\mu\text{g/g}$

TM) und Se-akkumulierend (20–40 mg/g TM). Selen-Gehalte wirken toxisch, sobald sie die angegebenen Konzentrationen überschreiten (*Marschner, 1995, S. 431*). Pak Choi zählt zu den sekundär-Se-Akkumulierern (*Zayed and Terry, 1992*). In Form von in- und organischem Se (*Pedrero and Madrid, 2009*) werden rund 70-95% des über Nahrungsmittel aufgenommenen Se vom Gastrointestinaltrakt (GIT) resorbiert (*Combs, 2001*). Als Se-Hauptlieferant gilt Fleisch (30%), gefolgt von Brot und Cerealien (18%), sowie Fisch (12%). Vegetarisch sowie vegan sich ernährende Menschen neigen demnach schnell zu einem Se-Mangel. Aufgrund dessen stellt die Se-Applikation eine effektive Maßnahme dar, den Gehalt in Nutzpflanzen zu steigern und den Se-Bedarf der Vegetarier zu decken (*Larsen et al., 2002*).

Selen steht aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit in ständiger Konkurrenz zu S. So werden beide z.B. über HAST aufgenommen (*Kopsell and Kopsell, 2007; Terry et al., 2000; Yoshimoto et al., 2007*). Angesichts dessen kann die Se-Aufnahme unter hoher S-Düngung herabgesetzt sein und *vice versa* (*Zayed and Terry, 1992*). So ist in S-armen Böden der Se-Gehalt in der Pflanze um das Siebenfache höher, als in S-reichen Böden (*Marschner, 1995, S. 433; Zayed and Terry, 1992*). Zudem durchlaufen beide Nährstoffe abschnittsweise den gleichen Pflanzenmetabolismus (Abb. 1-1). Vermutlich kann Se die Sulfatreduktion aufgrund antagonistischer Effekte senken, da nicht mehr S sondern Se Teil der S-Assimilation wird (*Bosma et al., 1991*).

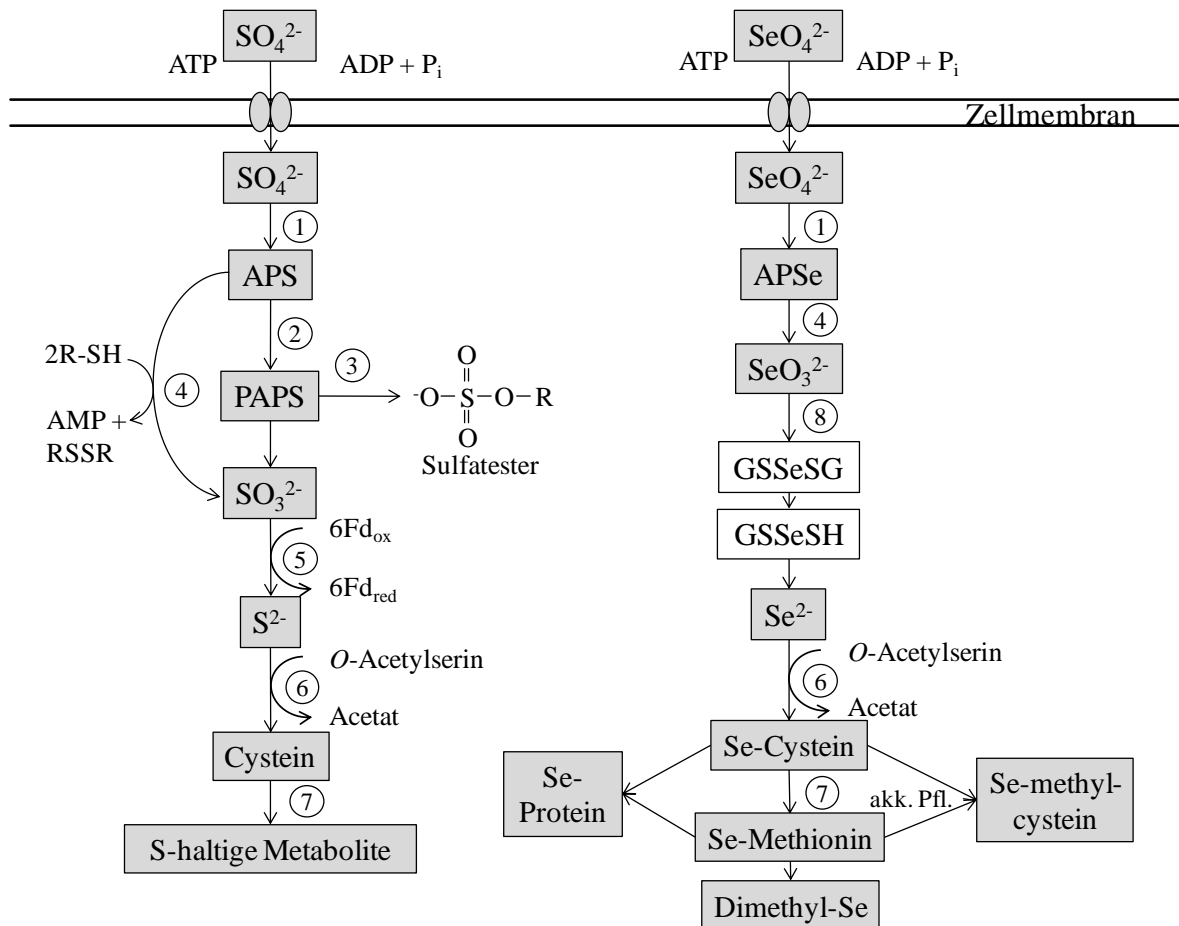


Abb. 1-1: Darstellung des S- bzw. Se-Metabolismus. S bzw. Se wird als Sulfat (SO_4^{2-}) bzw. Selenat (SeO_4^{2-}) aufgenommen. Durch ATP-Sulfurylase (1) entsteht Adenosinphosphosulfat (APS) bzw. -selenat (APSe). Durch Reaktion mit APS-Reduktase (4) entsteht Sulfit (SO_3^{2-}) bzw. Selenit (SeO_3^{2-}) und reagiert durch APS-Sulfotransferase (2) zu Phospho-APS (PAPS). PAPS reagiert durch PAPS-Sulfotransferase (3) zu Sulfatestern oder SO_3^{2-} , das mit Sulfitreduktase (5) und Ferredoxin (Fd) zu Sulfid (S^{2-}) reagiert. SeO_3^{2-} wird durch reduziertes Glutathion (8) zu Selenotrisulfid (GSSeSG), Selenoglutathion (GSSeSH) und Selenid (Se^{2-}). S^{2-} und Se^{2-} reagieren mit O-Acetylserin-(thiol)lyase (6) zu Cystein bzw. SeCystein und ermöglichen durch (7) Sulfhydryltransfer den Einbau in Metabolite oder Methionin. Seakkumulierende Pflanzen (akk.) metabolisieren Se-methylcys (modifiziert nach *Fuchs and Schlegel, 2007, S. 238; Haneklaus et al., 2007, S. 186; Marschner, 1995, S. 256, 519*).

Se und S konkurrieren zudem um Enzyme und weitere Proteine, welche sowohl in der S- als auch Se-Assimilation eine Rolle spielen. So ist GSH in beide Metabolismen involviert, da es sowohl Sulfit als auch Selenit zu SCys bzw. SeCys reduziert (*Anderson and McMahon, 2001*). Andererseits stimuliert Se HAST, wodurch die S-Aufnahme stimuliert wird (*Takahashi et al., 2011*). Entsprechend würde vermehrt S für die GLS-Synthese zur Verfügung stehen.

Da GLS und deren Hydrolyseprodukte S-haltig sind und Se in diese inkorporiert werden kann, führt eine hohe Se-Konzentration im Blatt zu einer Konkurrenz um GLS und GLS-HP (Finley et al., 2005). Generell ist der Wissensstand zur den Auswirkungen der Se- und S-Ernährung GLS und GLS-HP noch widersprüchlich (Barickman et al., 2013; Charron et al., 2001; Kopsell et al., 2009; Toler et al., 2007). Mit der Thematik der Seleno-GLS haben sich bisher lediglich vier Studien befasst (Bertelsen et al., 1988; Kjær and Skrydstrup, 1987; Matich et al., 2012; Wielanek et al., 2005). Aufgrund dessen trägt die vorliegende Arbeit den notwendigen Beitrag zum Erkenntniszuwachs über die Interaktion von Se und GLS bei.

1.3 Glucosinolate – sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in *Brassicaceae*

1.3.1 Pflanzliche Glucosinolatquellen

Bisher sind 16 Pflanzenfamilien bekannt, welche Glucosinolate (GLS) beinhalten: 15 davon gehören der Gattung blühender Kräuter oder Sträucher (*Capparales*) an. Darunter findet sich u.a. die Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*), mit bekannten Vertretern wie *Brassica oleracea* (z.B. Broccoli), *Brassica napus* (z.B. Raps) und *Brassica rapa* (z.B. Chinakohl).

Besonderer Fokus liegt in dieser Arbeit auf Pak Choi (*Brassica rapa chinensis*), da er eine große Vielfalt verschiedenster GLS aufweist. Er ist ein naher Verwandter des Chinakohls, bildet lockere Köpfe mit hellen Blattrippen und einen stark wasserhaltigen Strunk. Im Jahre 1994 importierte die BRD ca. 39 t Pak Choi. Während Pak Choi zu dieser Zeit noch als exotisches Gemüse galt, ist heutzutage die Nachfrage deutlich gestiegen, nicht zuletzt seiner nachgewiesenen gesundheitsfördernden Wirkung wegen (Kallabis-Rippel, 2000, S. 173).

1.3.2 Chemische Struktur der Glucosinolate

Glucosinolate rückten 1831 erstmals in den Fokus, als zwei französischen Wissenschaftlern die Extraktion und Identifikation des Sinalbins aus weißen Senfsamen gelang (Robiquet and Boutron-Charlard, 1831). Mittlerweile sind über 120 diverse GLS bekannt (Fahey et al., 2001). GLS setzen sich aus einem (Z)-N-Hydroximosulfatester, welches über thioglucosidische Bindung an β -D-Glucopyranose bindet, und einer variablen Seitenkette (R) (Abb. 1-2) zusammen. An diese Seitenkette können spezifische Aminosäuren (AS) binden, wodurch verschiedene GLS resultieren und eine Artenvielfalt der GLS ermöglicht wird.

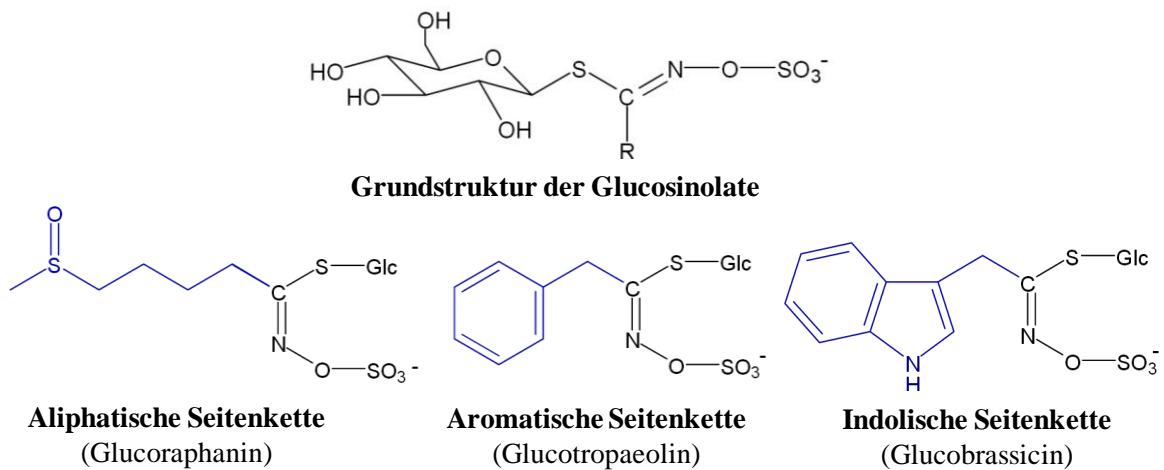


Abb. 1-2: Schematisierte Darstellung der Glucosinolat-Grundstruktur, sowie Glucosinolaten aliphatischen, aromatischen und indolischen Ursprunges (*Wittstock and Halkier, 2002*).

1.3.3 Glucosinolatbiosynthese in Nutzpflanzen

GLS werden anhand der AS klassifiziert, aus denen sie synthetisiert werden: (1) aliphatische GLS aus Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Valin, (2) aromatische GLS aus Phenylalanin und Tyrosin und (3) indolische GLS aus Tryptophan (*Halkier and Gershenzon, 2006*). Die GLS-Biosynthese verläuft in mehreren Schritten: Aminosäuren durchlaufen einen Zyklus aus Transaminierung, Kondensation, Isomerisierung und oxidativer Decarboxylierung, der bis zu elfmal hintereinander ablaufen kann. Die Seitenkette wird dabei um je eine Methyleneinheit verlängert (*Kjaer and Schuster, 1972*). Aus AS oder den seitenkettenverlängerten Derivaten wird Aldoxim gebildet. Letzteres reduziert mittels Glutathion-S-Transferase (GST) und Cystein (Cys) als S-Donor zu Thiohydroximat. Durch S-Glycosyltransferase (SGT) entsteht Desulfo-GLS, welches durch Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) als Sulfatdonor zu GLS sulfatiert (*Fahey et al., 2001*). Durch Oxidation oder Hydroxylierung wird R letztendlich modifiziert, so dass eine Vielzahl individueller GLS synthetisiert wird. Diese bilden das GLS-Muster (*Mithen et al., 1995*). Je nach Ursprung der Seitenkette werden die GLS klassifiziert in Alkylthioalkyle (Synonym aliphatische Alkyle; S-haltige Seitenkette), Olefine (Synonym aliphatische Alkenyle; gerade, verzweigte oder OH-haltige Seitenkette), aromatische und indolische GLS (*Fahey et al., 2001*). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Alkylthioalkyle und Olefine unter der Rubrik „aliphatische GLS“ zusammengefasst.

1.3.4 Lokalisation und Transport der Glucosinolate in der Pflanze

In der Pflanze besteht eine intrazelluläre Kompartimentierung der GLS, die zusammen mit AsA in der Vakuole oder in S-Zellen lokalisiert sind (Lüthy and Matile, 1984). S-Zellen sind charakteristisch für ihren hohen S-Gehalt, stellen ein durch eine Membran in sich geschlossenes System dar und liegen zwischen Phloem und Endodermis vor (Halkier and Gershenzon, 2006).

Das GLS-abbauende Enzym Myrosinase ist in myrosinase-exprimierenden Phloemzellen (Myrosinzelle) lokalisiert, welche ubiquitär in der Pflanze (z.B. *Brassica napus*) oder seltener zusammen mit den GLS subzellulär kompartimentiert in den Aleuronzellen (z.B. *Brassica juncea*) vorliegen (Andréasson et al., 2001; Kelly et al., 1998). Das epithiospezifische Protein (ESP), welches einen alternativen GLS-Hydrolyseschritt zur Myrosinase darstellt, ist in Epidermiszellen oder S-Zellen lokalisiert, steht jedoch nicht in direktem Kontakt zu GLS (Kissen et al., 2009). Bisher ist es nicht gelungen die subzelluläre bzw. zelluläre Kompartimentierung der GLS, Myrosinase und ESP umfassend zu klären, weshalb hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

Es steht zur Diskussion, ob GLS im Pflanzenmaterial verlagert werden könnten. Lykkesfeldt und Möller (1993) konnten den ersten Hinweis einer GLS-Verlagerung in *Tropaeolum majus* liefern. Vor Kurzem wurden die dafür verantwortlichen Glucosinolattransporter 1 und 2 (GTR1, GTR2) entdeckt (Nour-Eldin et al., 2012). Zudem wird vermutet, dass GTR1 für die Verlagerung innerhalb des Blattes, sowie dem Import in die S-Zellen zuständig ist (Nour-Eldin et al., 2012).

1.4 Glucosinolat-Hydrolyseprodukte – Abbauprodukte mit humanem Nutzen

1.4.1 Biosynthese der Hydrolyseprodukte

Nach mechanischer Zerstörung des Blattmaterials durch beispielsweise Schädlingsfraß oder Nahrungszubereitung treten GLS in direkten Kontakt mit der Myrosinase und werden enzymatisch hydrolysiert. Die Hydrolyse kann zudem durch chemische [KOH, BaCl₂ oder Ba(OH)₂]; (Gadamer, 1897a, 1897b)] oder thermische Einflüsse ablaufen. Bereits in frisch geerntetem Pflanzenmaterial, sowie während der Lagerung können hydrolytische Prozesse ablaufen (Herrmann, 2001).

Während der Hydrolyse wird die thioglucosidische Bindung am anomeren C-Atom der Glucose durch einen Bestandteil der Myrosinase (Glu 409) aufgelöst (Abb. 9-4) (*Burmeister et al.*, 2000). Es entsteht infolge der Glucoseabspaltung ein instabiles Thiohydroximat-O-sulfonat, welches die Ausgangsstruktur für die Synthese verschiedener GLS-HP darstellt. Unter optimalen pH-Bedingungen von 6–7 werden bevorzugt Isothiocyanate (ITC) synthetisiert, da die daran beteiligte *Lossen Verlagerung* spontan verläuft: dabei wird die Sulfatgruppe abgespalten, die Seitenkette auf das benachbarte N-Atom übertragen und eine Doppelbindung zum Sulfid ausgebildet (*Bones and Rossiter*, 2006). Bindet aber eine β -hydroxylierte Seitenkette am C2-Atom des GLS, entstehen instabile ITC, die weiter zu zyklischen Oxazolidin-2-Thionen (z.B. Goitrin) umgebaut werden. Liegt hingegen eine indolische Seitenkette vor, entstehen Alkohole [z.B. Indol-3-Carbinol (I3C)], welche zu Di-, Tri- oder Tetrameren abgebaut werden. Wenn AsA in nennenswerten Konzentrationen vorliegt und ein pH von 5–7 besteht, entstehen aus indolischen GLS Ascorbigen und diverse Oligomere (*Agerbirk et al.*, 2009; *Bones and Rossiter*, 2006). Thiocyanate werden durch ein Thiocyanat-formendes-Protein (TFP) synthetisiert, jedoch nur, wenn aus den Seitenketten stabile Carbokationen entstehen, die einen elektrophilen Angriff auf das Sulfid-Anion erlauben. Thiocyanate entstehen daher nur aus drei verschiedenen GLS: Allyl-, Benzyl- und Methylsulfinylbutyl-GLS (*Holst and Williamson*, 2004). Oftmals wird die positiv geladene Seitenkette auf S verlagert und Nitrile entstehen. Diese werden bevorzugt unter saurem pH (< 3) durch ESP und Fe^{2+} aus den instabilen Thiohydroximaten synthetisiert (*Bones and Rossiter*, 2006). Die S-haltigen Epithionitrile werden unter den gleichen Voraussetzungen wie sie bei der Nitrilsynthese vorgegeben sind metabolisiert, jedoch mit der Voraussetzung einer ungesättigten GLS-Seitenkette. Aus dieser Doppelbindung entsteht der für Epithionitrile charakteristische Thiranring (*VanEtten et al.*, 1966) (Abb. 1-3, Abb. 9-3).

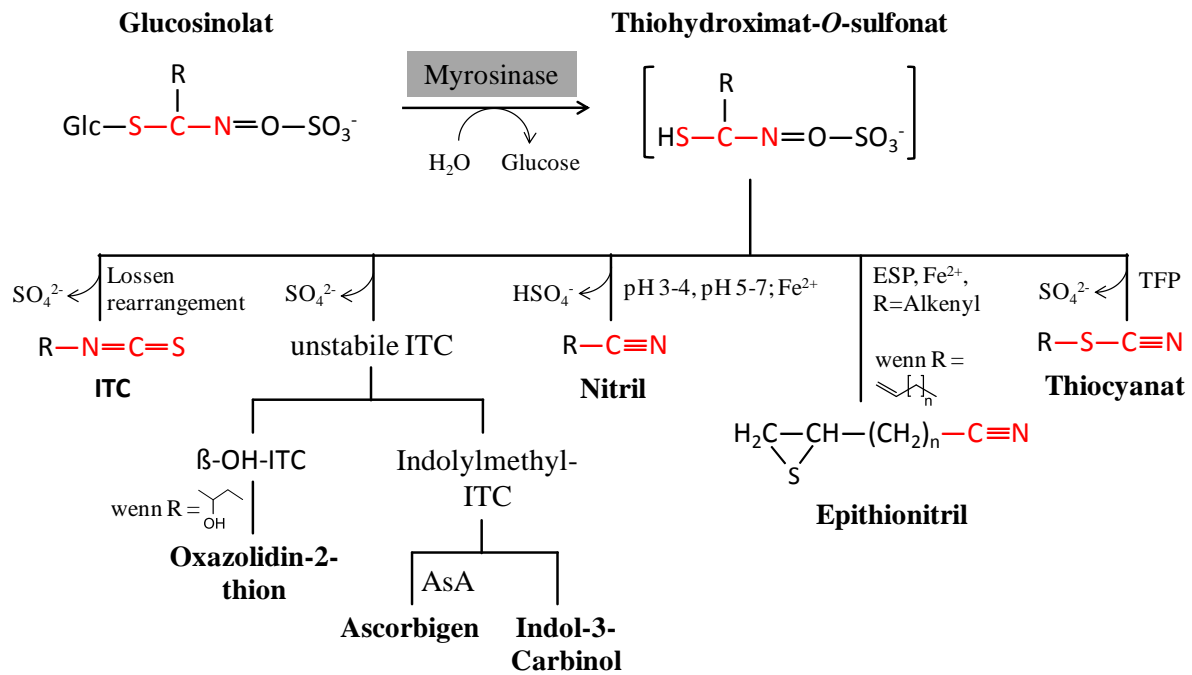


Abb. 1-3: Während der Glucosinolat-Hydrolyse mittels Myrosinase entsteht Thiohydroximat. In Abhängigkeit von pH-Wert, Fe²⁺, Epithiospezifisches Protein (ESP), Thiocyanat-formendes-Protein (TFP) oder ungesättigte Seitenkette entstehen Isothiocyanate (ITC), Nitrile, Epithionitrile oder Thiocyanate. Instabile ITC mit einer OH-Seitenkette reagieren zu Oxazolidinthione oder zu Indolmethyl-ITC, welche zu Indol-3-Carbinol (I3C) oder mit Ascorbinsäure (AsA) zu Ascorbigen metabolisieren. R = Seitenkette aliphatischer, aromatischer oder indolischer GLS (modifiziert nach *Bones and Rossiter, 2006; Heldt and Piechulla, 2008, S. 390*).

1.4.2 Pflanzenphysiologische Funktionen der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte

Die GLS-HP sind als SPI per Definition für die Pflanze nicht essentiell. Durch ihre Bitterkeit wirken sie als aktive Abwehrstoffe Schädlingen entgegen (*Bones and Rossiter, 2006*). Infolge mechanischer Verletzung geraten GLS und Myrosinase in direkten Kontakt und die enzymatische Hydrolyse zu GLS-HP wird initiiert. Zudem wirken v.a. ITC allelopathisch und können die Saatkeimung anderer Pflanzen bis zu 100% hemmen (*Brown and Morra, 1995*). GLS-HP wirken weiterhin fungitoxisch und unterdrücken z.B. mycorrhizale Strukturen an der Wurzel (*Mari et al., 2002*). Im Gegensatz dazu wird vermutet, dass GLS-HP indirekt das Wachstum stimulieren können, indem Indol-3-Essigsäure (IES) aus dem Nitril Indol-3-Acetonitril (IACN) synthetisiert wird. Als Bestandteil der Auxinsynthese ist IES am Streckungswachstum beteiligt (*Bartel and Fink, 1994*). Weiterhin wird vermutet, dass GLS und GLS-HP als N- und S-Reservoir dienen könnten, auf welches die Pflanze unter Nährstoffmangel zurückgreifen kann (*Holst and Williamson, 2004; Schnug, 1990*).

1.4.3 Wirkung der GLS-HP auf antioxidative Prozesse und Krebs

Der gesundheitsfördernde Effekt der GLS-HP wird nicht nur durch *in vitro*-Studien bestätigt (Chung *et al.*, 2000; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Emmert *et al.*, 2010; Gamet-Payraastre *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998). Auch eine Vielzahl epidemiologischer Studien belegt, dass ein hoher *Brassica*-Verzehr das Krebsrisiko in Darm (Lin *et al.*, 1998), Lunge (Carpenter *et al.*, 2009; Spitz *et al.*, 2000), Magen (Hansson *et al.*, 1993), Brust (Ambrosone *et al.*, 2004), Blase (Zhao *et al.*, 2007) und Prostata (Giovannucci *et al.*, 2003; Kirsh *et al.*, 2007) senkt. Jedoch ist stets auf die Art der verzehrten GLS-HP zu achten. Wie sich im Kapitel zeigen wird, lösen die verschiedenen GLS-HP diverse Mechanismen aus. Die gesundheitsfördernde Wirkung verläuft auf diversen Ebenen. Insbesondere ITC intervenieren in die Phasen der Krebsentstehung durch z.B. Stoppen des Zellzyklusses initiiertter Zellen in der G1-Phase (Cornblatt *et al.*, 2007), Proliferationshemmung (Thornalley, 2002) oder Einleitung der Apoptose. Dabei reagieren ITC nach passiver Diffusion ins Cytosol mit GSH mittels GST zu GSH-Konjugaten [RNHC(=S)-SG] oder mittels Thiocarbamoylation reversibel zu Protein-thiole. Letzteres induziert über eine Signalkaskade die Apoptose (Thornalley, 2002). Einige GLS-HP wirken zudem auf die Genexpression antioxidativer Enzyme: Unter oxidativen Bedingungen greifen die reaktiven R-SH der GLS-HP in den Signalweg des Transkriptions-faktors *Nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2* (Nrf2) ein (Banning *et al.*, 2005). Unter Normalbedingungen bindet Nrf2 im Cytosol an das *Kelch-like ECH-associated Protein-1* (Keap1). Durch R-SH oxidieren die in Keap1 befindlichen Cysteinreste und Disulfidbrücken werden ausgebildet. Es kommt zur Konformationsänderung und die Affinität zu Nrf2 wird aufgehoben (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002). Nrf2 akkumuliert im Cytosol und gelangt in den Nukleus (Wakabayashi *et al.*, 2004). Dort bindet er durch Heterodimerbildung mit Leucin Zipper (bZIP) an das Antioxidative Response Element (ARE) der Promotorregion antioxidativer Enzyme. Die Folge ist eine induzierte Genexpression und antioxidative Antwort auf oxidativen Stress (Banning *et al.*, 2005) (Abb. 1-4). Generell unterliegt der krebspräventive Mechanismus noch intensiver Forschung. Zudem ist das Wissen zur Nitrilphysiologie noch lückenhaft. Möglicherweise da bisher wenige bioaktive Nitrile bekannt sind (Keck and Finley, 2004). Des Weiteren ist deren Wirkung auf Phase-I und Phase-II-Enzyme noch widersprüchlich: Ihnen werden sowohl eine induzierende, inhibierende oder keine Wirkung darauf zugeordnet. Zudem ist deren Wirkung weniger effektiv als die der ITC (Basten *et al.*, 2002; Haack *et al.*, 2010; Keck and Finley, 2004). Letztendlich werden ITC den Nitrilen bevorzugt, da deren krebspräventive Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewiesen ist.

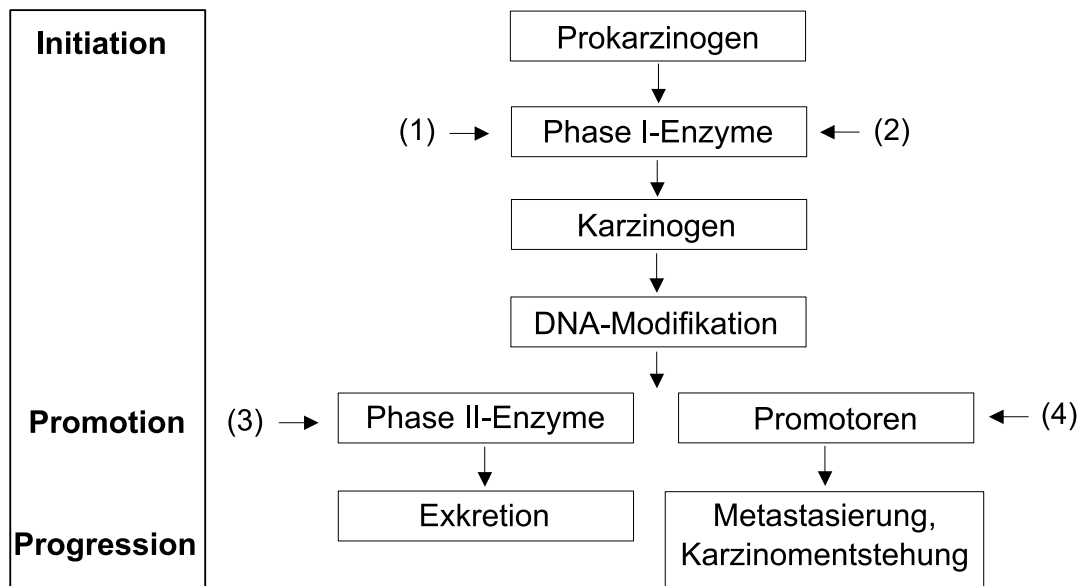


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Karzinomentstehung und Einwirkung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte. Die Einflussnahme geschieht durch Induktion der Phase I-Enzyme (1), Inhibierung der Phase I-Enzyme (2), Induktion der Phase II-Enzyme (3) und Hemmung der Tumorpromotion (4) (modifiziert nach *Horn et al.*, 2002; *Das et al.*, 2000).

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Aufgrund der zuvor erläuterten Problematik ist das Ziel der Arbeit in unterschiedlichen Gefäßversuchen mit variiertem S- (Mangel, moderat und Luxus) und N- (niedrig und moderat) Düngung in Pak Choi die optimalen Angebotsbedingungen der beiden Nährstoffe aufzudecken, um eine signifikante Anreicherung der GLS und GLS-HP zu erreichen. Die Besonderheit ist, dass Pak Choi ein sehr breites GLS-Muster aufweist. Somit kann zudem das Düngungsangebot von N und S auf bestimmte GLS-Typen spezifiziert werden. Darauf basierend wird die Auswirkung der Düngung auf die Konzentration und das Muster der Hydrolyseprodukte untersucht. Neben der Konzentration und Synthese individueller GLS-HP liegt der Fokus auf dem ITC/Nitril-Verhältnis als potentieller Gesundheitsparameter. Erstrebenswert ist demnach die Bestimmung einer optimalen S- und N-Düngung, damit bevorzugt aliphatischer GLS und ITC in der Pflanze synthetisiert werden, da ihre gesundheitsfördernde Wirkung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurde.

Weiterhin soll der Einfluss einer Se-Blattapplikation auf die gesundheitsfördernden GLS-HP und deren Vorstufen untersucht werden, da die bisherigen Versuchsergebnisse einer Se-Düngung auf GLS und GLS-HP in Kulturpflanzen noch widersprüchlich sind. Infolgedessen wird im zweiten Teil der Arbeit analysiert, ob eine variierte Se-Blattapplikation (0, 0,5, 2, 20 und 30 mg Se/Pflanze) sowohl die Konzentration als auch das Muster der GLS und GLS-HP beeinflussen kann. Als weiteres wird untersucht, ob dieser Einfluss zudem Se-konzentrationsabhängig ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material- und Chemikalienliste

Im Folgenden sind alle Geräte, Materialien und Chemikalien mit Modelname, Hersteller und Herkunftsort angegeben, welche sowohl für den ersten Versuch V1.3. einer variierten N- und S-Düngung als auch für den zweiten Versuch V2.4. einer Se-Blattapplikation auf GLS und GLS-HP in Pak Choi verwendet wurden.

Tab. 3-1: Liste der verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien

Substanz, Model	Hersteller/Vertrieb
Geräte	
Analysenmühle A11 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Ionenchromatograph ICS 2500	Dionex Softron GmbH, Germering
Elementaranalyse vario MAX CNS	Elementar Analysesystem GmbH, Hanau
Gefriertrocknung Gamma 1-20	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz
HPLC Agilent 1100	Agilent Technologies, Waldbronn
Kugelmühle MM400	Retsch GmbH, Haan
Labormühle Cyclotec 1093	Foss GmbH, Rellingen
pH Elektrode 520A	Orion Research Incorporated, Boston, USA
Schüttelwasserbad SWB20	Medingen Co. KG, Dresden
Suprafuge 22	Heraus Sepatech, Hamburg
Ultra turrax T18 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortex Lab dancer vario yellow line	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage A200 Sartorius	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage CP64 Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Materialien	
Bakerbond SPE Kartuschen	Altmann Analytics, München
Bewässerungsanlage (automatisiert) 1398-20 Micro-Drip-System	Gardena Manufacturing GmbH, Ulm
Eppendorf-Cups (1000, 1500,2000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Exsikkator	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Falconröhrchen (10, 15, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Gewindeflaschen Rotalibo (20 ml)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Mikroskop DMI6000B	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

SPE-C18 Kartuschen	Phenomex, Aschaffenburg
Tin cups (5 x 9 mm)	IVA-Analysentechnik e. K., Meerbusch

Chemikalien

Ammoniummolybdat ((NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Bariumacetat (C ₄ H ₆ BaO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzonitril (C ₇ H ₅ N)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Malinckrodt Baker B.V., Niederlande
Dichlormethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Kaliumhydrogensulfat (K ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen-EDTA (Fe-EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Kaliumsulfat (K ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Kalziumnitrat (Ca(NO ₃) ₂)	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Kupfersulfat (CuSO ₄ * 5 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₂)	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Mangansulfat (MnSO ₄ * H ₂ O)	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH und Co. KG , Karlsruhe
Natriumselenat (Na ₂ SeO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nickelsulfat (NiSO ₄ * 6 H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Previkurlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salpetersäure (HNO ₃ , 6%ig)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Schädlingsbekämpfung Karate mit Zeontechnologie	Syngenta Agro GmbH, Maintal
Sephadex CM C-25	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sephadex DEAE A25	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silwet ®	Spiess Urania, Hamburg
Sinigrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Soja Standard	IVA-Analysentechnik e.K., Meerbusch
Sulfatase	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Wolfram-(IV)-Oxid	IVA-Analysentechnik e.K., Meerbusch
Zinksulfat (ZnSO ₄ * 7 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt

Testsubstanz

Saatgut <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>chinensis</i> cv. <i>Joi Choi</i>	Bruno Nebelung GmbH, Everswinkel
--	----------------------------------

3.2 Versuchsteil 1: Einfluss einer variierten Stickstoff- und Schwefel-Düngung auf Glucosinolate und Hydrolyseprodukte in Pak Choi

Für das Experiment wurde die Sorte *Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* gewählt, da sie im Vergleich zu anderen Pak Choi-Sorten deutlich höhere GLS-Konzentrationen (Kallabis-Rippel, 2000, S. 229) sowie ein breites Muster individueller GLS aufweist (Kallabis-Rippel, 2000, S. 167, 119). Zudem wird die Sorte tatsächlich vermarktet und aufgrund des typischen Kohlcharakters und der milden Süße von 80% der Konsumenten bevorzugt (Kallabis-Rippel, 2000, S. 139–140, 229). Die ungebeizte F1-Form des Saatgutes wurde mit 1 L einer 0,3%igen Previkurlösung in einer Palette angezogen. Nach zehn Tagen wurden je Mitscherlichgefäß drei Setzlinge in 7,0 kg eines Bodensubstratgemisches aus S-armen Boden „Ostenfeld“ und Quarzsand „My Pool“ umgetopft (2:1:1 Quarzsand 1,2–1,4 mm:Quarzsand 0,4–0,8 mm:Ostenfeld). Aufgrund des sterilisierten Quarzsandes konnten die S- und N-Gehalte kontrolliert in den in Tab. 3-2 angegebenen Konzentrationen mit jeweils vier biologischen Wiederholungen gestaffelt werden (24 Gefäße). Die Düngung setzte sich aus den Festsubstanzen [g/Gef.] S als CaSO_4 [0, 0,06, 0,3], N als NH_4NO_3 [0,5 und 1,5], Ca als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ [0,3] und CaCO_3 [1,5], Fe als FeCl_2 [0,05], K als KNO_3 [0,6], Mg als $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ [0,3], sowie Mn als MnCl_2 [0,03], Cu als CuCl_2 [0,01], Zn als ZnCl_2 [0,015], Bor als H_3BO_3 [0,01] und Mo als $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$ [0,002] zusammen. Laut der Bodenanalyse enthielt „Ostenfeld“ 0,49 mg S/100 g, 0,13% N_{Ges} und 2,3 g organisches S/100 g (Tab. 9-8). Um einen Ionenstress zu vermeiden wurde die N- und K-Düngung beim Ansetzen der Gefäße nur zur Hälfte gegeben. Die Nachdüngung erfolgte mit 0,41 g N und 0,3 g K pro Gefäß (29.05. 2013).

Tab. 3-2: Konzentration der applizierten Schwefel- und Stickstoff-Düngung

Bezeichnung	Gefäß n°	N-Gehalte [g]	S-Gehalte [mg]
S0N1	1 – 4	0,75	0
S0N2	5 – 8	1,50	0
S1N1	9 – 12	0,75	60
S1N2	13 – 16	1,50	60
S2N1	17 – 20	0,75	300
S2N2	21 – 24	1,50	300

Täglich wurde auf ein Gesamtgewicht von 8,2 kg/Gefäß (= 65% Wasserkraft) mittels einer automatisierten Bewässerungsanlage (Gardena Manufacturing GmbH, Ulm) gegossen. Die Ernte erfolgte in den Morgenstunden nach 64 Tagen (10.4.–13.06.13). Rund 70% der

Pflanzen wurden nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Aktivität der Myrosinase stoppen zu können. Anschließend wurde das Material über 72h gefriergetrocknet. Die restlichen 30% wurden nach Behandlung mit flüssigem Stickstoff bei -20°C zwischengelagert. Die Pflanze wurde in 2 Fraktionen (junge und alte Blätter) aufgeteilt. Letztendlich wurden jedoch bei der Auswertung alle Fraktionen auf die komplette Pflanze zurückgerechnet.

Es wurden zwei weitere Versuche nach dem gleichem Prinzip angesetzt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu bestärken. Im Ergebnisteil werden die Ergebnisse aus Versuch V1.3. detailliert erläutert, um anschließend im Diskussionsteil mit den Ergebnissen von Versuch V1.1. und V1.2. verglichen und ausdiskutiert zu werden.

3.3 Versuchsteil 2: Auswirkungen einer Selenblattapplikation auf die Glucosinolate und deren Hydrolyseprodukte in Pak Choi

Für den zweiten Versuchsteil wurde die gleiche Pak Choi-Sorte *Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* verwendet, welche unter die Rubrik sekundär-Se-akkumulierender Pflanzen fällt. Somit bestand die Möglichkeit sehr hohe Se-Konzentrationen ohne Auslösung toxischer Effekte zu applizieren, zur Erzielung entsprechend starker Se-Effekte. Zudem ermöglicht die Blattapplikation eine Aussage darüber, ob der laut Literatur GLS-reduzierende-Effekt alleine auf einer S-Se-Aufnahmekonkurrenz basiert oder nicht. Die Samen wurden am 31.01.2014 mit 1 L einer 0,3%igen Previkurlösung ausgesät. Nach 12 Tagen (11.02.) wurden je drei Setzlinge in 10 L Hydrokultureimern mit Nährlösung (Tab. 9-3) umgetopft. Zu Beginn wurden 50% der Nährlösung angesetzt und nach fünf Tagen auf 100% vervollständigt. Am 20.01. wurden die Pflanzen vereinzelt. Der Versuch wurde im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen (Tag: 14h, 19°C , 50%rLF; Nacht: 10h, 14°C , 40% rLF, Lichtzeit: 10:00-15:00, nach 10 Tagen 08:00-18:00) durchgeführt. Die Nährlösung wurde 1-mal wöchentlich gewechselt (28.02, 06., 14., 20. und 27.03.).

Selen wurde in Form von Natriumselenat (Na_2SeO_4) über das Blatt appliziert, mit dem für den Versuch zentralen Vorteil, dass die Konkurrenz mit S umgangen wird. Zudem kann Se im Boden nicht an andere Nährstoffe binden und eine Aufnahme verhindern. Weiterhin wird die Gefahr einer Überdosierung im Feld reduziert. Die Blattapplikation erfolgte mit Hilfe eines Pinsels auf der Blattoberseite (21.03. und 28.03.). Eine Methode, die sich im Rahmen vorhergegangener Versuche (V2.1. a, V2.1. b und V2.2.) (Tab. 9-4) bewährt hat. Eine

Pinselapplikation ist im Vergleich zum Aufsprühen mit der Sprühflasche gezielter und eine Tröpfchenbildung sowie Abtropfverluste werden verhindert. Die mikroskopische Analyse (DMI6000B, Leica Microsystems, Wetzlar) zeigte, dass sich Stomata sowohl auf der Ober- als auch Unterseite befinden. Zur besseren Aufnahme der Se-Applikation wurde Silwet (0,04%) als Benetzungsmittel zugegeben. Aufgrund einer zweimaligen Applikation erhielt jede Pflanze 20 ml der Se-Lösung. Es wurden fünf verschiedene Se-Konzentrationen mit jeweils vier biologischen Wiederholungen angesetzt (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Konzentration der über das Blatt applizierten Selenlösung

Kennzeichnung	mmol Se/L	mg Se/L	mg Na ₂ SeO ₄ /L	mg Se/Pflanze	mg Na ₂ SeO ₄ /Pflanze
Se0 (1-4)	0	0	0	0	0
Se1 (5-8)	0,32	25	59,75	0,5	1,20
Se2 (9-12)	1,27	100	239,00	2,0	4,78
Se3 (13-16)	12,67	1000	2390,07	20	47,80
Se4 (17-20)	19,00	1500	3585,11	30	71,70

Am 03.04 wurde die GLS-HP-Methode an frischem Material durchgeführt. Hierfür wurde jeweils drei Blätter verschiedener Wachstumsstadien verwendet. Am Folgetag wurde geerntet. Nach einer Behandlung mit flüssigem Stickstoff wurden 50% der Pflanze über 86h gefriergetrocknet (Gamma 1-20, Martin Christ GmbH), der restliche Teil wurde in der Kühlkammer bei -20°C zwischengelagert.

3.4 Die analytische Parametererfassung

3.4.1 Bestimmung von Frisch-, Trockenmasse und Gesundheitsstatus

Die Frisch- und Trockenmasse des Pflanzenmaterials wurden gravimetrisch (Waage A200, Sartorius GmbH, Göttingen) erfasst. Zudem wurde der Gesundheitsstatus indirekt durch Bestimmung des Chlorophyllbestandes bestimmt. Die Transmissionsmessung erfolgte an fünf Stellen des Blattes mittels des SPAD-Analyzers (SPAD-502, Minolta).

3.4.2 Elementaranalyse zur Stickstoff- und Schwefelbestimmung

Jeweils 5–10 mg der lyophilisierten Pflanzenprobe wurden in Tin-cups (5 x 9 mm) abgewogen. Zusätzlich wurde Wolfram-(IV)-Oxid in der gleichen bis doppelten Einwaage der Probe zur besseren Verbrennung hinzugesetzt. Zur Kalibrierung wurden zu Beginn sechs Standards, sowie je ein Sojastandard mit bekannten Konzentrationen (0,4% S und

4,8% N) nach jeder 9. Probe als Kontrolle gemessen. Die N- und S-Analyse erfolgte am Elementaranalysator. Der Gasfluss des Carriergases Helium lag bei 140 ml/min, Sauerstoff bei 250 ml/min und das Referenzgas bei 100 ml/min. Der Detektor wurde vor jeder Messung auf 1000 μ V geeicht, der Ofen auf 900°C erhitzt. Alle Leaktests ergaben stets eine hohe Dichtigkeit von 5–8 ml/min.

3.4.3 Analytische Sulfat- und Nitratbestimmung mittels IC

Lypholisiertes Pflanzenmaterial (20 mg) wurde in 2 ml Reaktionsgefäße mit 1 ml Reinstwasser überführt. Über 5 min wurde die Probe in ein auf 100°C vorgewärmtes Schüttelbad (Medingen SWB20, Dresden) gestellt und für weitere 5 sek. mittels eines Vortexes vermennt. Die Probe wurde zum Abkühlen über 30 min auf Eis gestellt und im Anschluss über 5 min. bei 13.000 Umdrehungen pro Min (rpm) zentrifugiert. Die überstehende Lösung der aufgearbeiteten Probe wurde entnommen und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Durch wenige Tropfen Chloroform wurde die Proteinausfällung eingeleitet und ein Verkleben der Säule bei während der anschließenden Messung verhindert. Die Probe wurde ein weiteres Mal mit dem Vortex (5 sek.) vermennt und zentrifugiert (13.000 rpm, 3 min). Die untere Phase mit Chloroform und den darin gebundenen Proteinen wurde verworfen, während die obere Phase entnommen und durch C-18-Kartuschen mit Filter aufgereinigt wurde. Je 600 μ l der Probenlösung wurde in Vials umgefüllt und mittels IC gemessen.

3.4.4 Identifizierung und Quantifizierung der GLS mittels HPLC

Für die Analyse der GLS wurden 0,25 g lypholisiertes Probenmaterial für 1 min im Wasserbad (75°C) erhitzt. Nach Zugabe von 100 μ l des internen Standards Sinigrin (5 mmol/L) und 2 ml 70%igen Methanol (70°C) erfolgte die Extraktion. Die Proben wurden über 10 min im Wasserbad erhitzt (75°C). Nach Zugabe von 500 μ l 0,4 m Bariumacetat-Lösung wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 6300 U/min). Die überstehende Lösung wurde in 5 ml Messkolben abdekantiert. Auf jedes Sediment wurde weitere zweimal 1,5 ml 70%iges Methanol gegeben, zentrifugiert und zu den Extrakten hinzugefügt. Mit Reinstwasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt (Rohextrakt). Die Trennsäulen wurden mit einer 200 μ m Fritte unterhalb des Sorbens abgetrennt, mit 200 μ l acetaktivem DEAE Sephadex A 25 aufgefüllt und mit Seesand oberhalb des Sorbens abgedeckt. Je 5 ml des Rohextraktes wurden in die Trennsäule gegeben und aufgefangen. Anschließend wurde mit 5 ml Reinstwasser gespült und das Filtrat verworfen. In die Trennsäule wurden 250 μ l Sulfatase geben und 12 h bei Raumtemperatur verschlossen

stehen gelassen. Nach 12h wurden 5 ml Reinstwasser auf jede Trennsäule gegeben. Die Eluate wurden aufgefangen und durch Spritzenfilter filtriert. In Rollrandgläsern konnten die Eluate bei -18°C über eine längere Zeit aufbewahrt werden. Das Eluat (500 µl) wurde in HPLC-Vials gefüllt und analysiert. Folgende Parameter wurden genutzt: Säulentemperatur bei 30,0°C, Druck bei 230 bar, Temperatur des Probenbrettchens bei 8,0°C und einem Injektionsvolumen von 100 µl. Es wurde die Säule Col SC (Bischoff Analysetechnik und –geräte GmbH (250 x 4 mm)) und die stationäre Phase ProntoSIL Spheribond ODS2 (Ø 5 µm) verwendet. Durch Auftrennung des Stoffgemisches in der Säule, werden GLS anhand der Retentionszeiten und Responsefaktoren identifiziert (Tab. 9-1). Mittels der folgenden Formel wurden die GLS in µmol/g TM berechnet (*Deutsches Institut für Normung*, 1995):

$$A(GLS)_i = \frac{F(GLS)_i \times RF(GLS)_i}{F(IS) \times RF(IS)} \times \frac{n}{m} \quad (1)$$

$A(GLS)$ = GLS-Konzentration [µmol/g TM]; $F(GLS)_i$ = Peakfläche des i-ten GLS; $RF(GLS)_i$ = Retentionsfaktor des i-ten GLS; $F(IS)$ = Peakfläche des internen Standards; $RF(IS)$ = Retentionsfaktor des IS; n = Konzentration des IS [µmol]; m = Probeneinwaage [g]

3.4.5 Analytische Erfassung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte

Frisches Probenmaterial (3 g) wurde mit 10 ml dest. Wasser und 500 µl Benzonnitril (1:10.000 Benzonnitril:MeOH) versetzt und homogenisiert (1 min, 13.000 U/min). Über 30 min ruhten die Proben bei Raumtemperatur. Je 2,61 ml Probe wurden in ein Zentrifugenröhrchen (12 ml) überführt. Diese Menge entsprach 600 mg Probe, 2 ml dest. Wasser und 100 µl Benzonnitril. Die Probenlösung wurde mit 4 ml DCM versetzt, über 6 Sek. mit dem Vortex vermischt und 4 min bei 3500 x g (= 8840 U/min) und 20°C zentrifugiert. Die DCM-Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Das verbliebene Probenmaterial wurde abermals mit 4 ml DCM versetzt und zentrifugiert (4 min, 20°C, 3500 x g). Die DCM-Phase wurden in das separate Zentrifugenröhrchen hinzugefügt und mit einer großen Spatelspitze Na₂SO₄ zum Entzug verbliebener Wassergehalte versetzt und zentrifugiert (4 min, 20°C, 3500 x g). Die Lösung wurde in 20 ml Gewindeflaschen mit DCM-beständigen Schraubdeckeln gefüllt und bei -20°C gelagert. Die GC-MS-Messung erfolgte im Max Planck Institut für Chemische Ökologie in Jena mittels des Agilent 6890 Series Gaschromatographen. Wasserstoff diente als Trägergas. Die Säule HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film) wurde an einen

Flammenionisationsdetektor (300°C) gekoppelt. Zur Komponentenidentifikation wurde dasselbe GC-System mit der oben genannten Säule und Helium als Trägergas genutzt. Das System ist an einen Agilent 5973N Detektor eines Quadrupole-Massenspektrometers gekoppelt. Die Parameter zur Elektronenstoßionisation – eine klassische Methode der Ionisation – waren wie folgt: Interfacetemperatur 280°C, Repeller 30 V, Emission 34,6 µA, Elektronenenergie 70eV und 230°C. Die chromatographischen Bedingungen waren in beiden Systemen dieselben: Die Injektion erfolgte bei 200°C, stieg 3 min auf 35°C, weiter auf 96°C (12°C/min) und für 6 min auf 240°C (18°C/min).

3.4.6 Analyse der Selenkonzentration im Pflanzenmaterial

Die Selenanalyse erfolgte mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) an der LUFA Kiel nach DIN EN ISO 17294-2 (*Deutsches Institut für Normung*, 2005). Das Probenmaterial wurde dort im lyophilisierten und feingemahlten Zustand (mittels Labormühle Cyclotec 1093) abgeliefert und analysiert.

3.4.7 Statistische Datenauswertung

Die statistische Analyse erfolgte mittels der Statistik-Software „R“ (2013). Zu Beginn wurden für die jeweiligen Messgrößen ein generalisiertes lineares Least-Squares-Model definiert (*Carroll and Ruppert*, 1988). Die jeweiligen Messwerte wurden als normalverteilt angenommen und bezüglich der Schwefel- sowie der Stickstoffstufen entweder als varianzheterogen (Parameter: N, S, N/S-Verhältnis, NO₃, SO₄, FM, TM, Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), GLS, sowie aliphatische, aromatische und indolische GLS) oder varianzhomogen (Parameter: Gesamtkonzentration der GLS-HP, der ITC, der Nitrile und der Epithionitrile (Epi), 2-Phenylethyl-Isothiocyanat (2PEITC), 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), 2-Pentenyl-Cyanid (2Pent-CN), 4-Pentenyl-Cyanid (4Pent-CN), Indolacetonitril (IACN), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates (Epi 3But) und des 4-Pentenyl- Glucosinolates (Epi 4-Pent), das ITC/Nitril- sowie das ITC/Epithionitril-Verhältnis) gruppiert. Diese Modellannahmen wurden alle mittels einer Residuenanalyse streng überprüft. Die statistischen Modelle beinhalteten jeweils die Faktoren N (N1, N2), S (S0, S1, S2) sowie deren Wechselwirkungsterm (S:N). Auf Basis dieser Modelle wurde eine ANOVA (*Hartung et al.*, 2005, S. 218, 358) durchgeführt. Für den Vergleich der Mittelwerte folgten im Anschluss multiple Kontrasttests (*Bretz et al.*, 2010). Hierfür wurden

entsprechende Pseudo-Einweg-Modelle (*Schaarschmidt and Vaas, 2009*) zugrunde gelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde bei 5% festgelegt ($p < 0,05$). Die statistische Signifikanz wurde jeweils über bzw. unter den Boxplots angegeben. Für den S-Effekt wurden Großbuchstaben (Vergleich der ersten drei sowie der letzten drei Boxplots untereinander), für den N-Effekt Kleinbuchstaben (Vergleich der gleichfarbigen Boxplots miteinander) gewählt. Für den Se-Effekt im Se-Experiment wurden statistisch signifikante Unterschiede durch Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

4 VERSUCHSERGEBNISSE

Die Arbeit setzt sich aus zwei Themenschwerpunkten zusammen: Der erste Teil befasst sich mit den Einflüssen einer variierten N- und S-Düngung auf GLS und deren Hydrolyseprodukte in Pak Choi. Es wurden drei auswertbare Versuche durchgeführt, von denen der letzte Versuch V1.3. im Ergebnisteil detailliert beschrieben wird. Im Diskussionsteil werden die beiden weiteren Versuche V1.1. und V1.2. miteinbezogen und ausdiskutiert. Der zweite Themenbereich befasst sich mit einer steigenden Se-Konzentration, welche über das Blatt appliziert wurde, mit Analyse der Einflussnahme auf Konzentration und Muster der GLS- und GLS-HP. Vertiefend ist das ITC/Nitril-Verhältnis von großem Interesse. Einer der vier angesetzten Versuche (V2.4.) wird im Ergebnis- und Diskussionsteil detailliert erläutert und interpretiert.

4.1 Ergebnisse einer variierten N- und S- Düngung auf einzelne Parameter in Pak Choi mit Fokus auf GLS und GLS-HP

Im folgenden werden die Versuchsergebnisse der Arbeit mit besonderen Schwerpunkt auf die GLS und deren Hydrolyseprodukte dargestellt.

4.1.1 Einfluss der variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Frisch-, Trockenmasse und allgemeines Befinden der Pflanze

Unter S-Mangelbedingungen und der N1-Düngung lag die FM bei 323,15 g, in S1 bei 437,75 g und erreichte mit S2 448,06 g (Tab. 9-7C). Letzterer Wert unterschied sich nicht signifikant zum S1-Wert. Unter einem höherem N-Niveau (N2) erzielt die Pflanze eine höhere FM, jedoch lediglich mit statistischer Signifikanz in S2. Die TM variierte mit steigender S- und der niedrigeren N-Düngung (Tab. 9-7C, Abb. 4-3B). Während ein S-Mangel unter höherem N-Level zu einer TM von 35,07 g führte, lag diese mit S1 bei 37,16 und S2 bei 48,04 g (Tab. 9-7C). Keiner der Werte war statistisch signifikant (Abb. 4-3B).

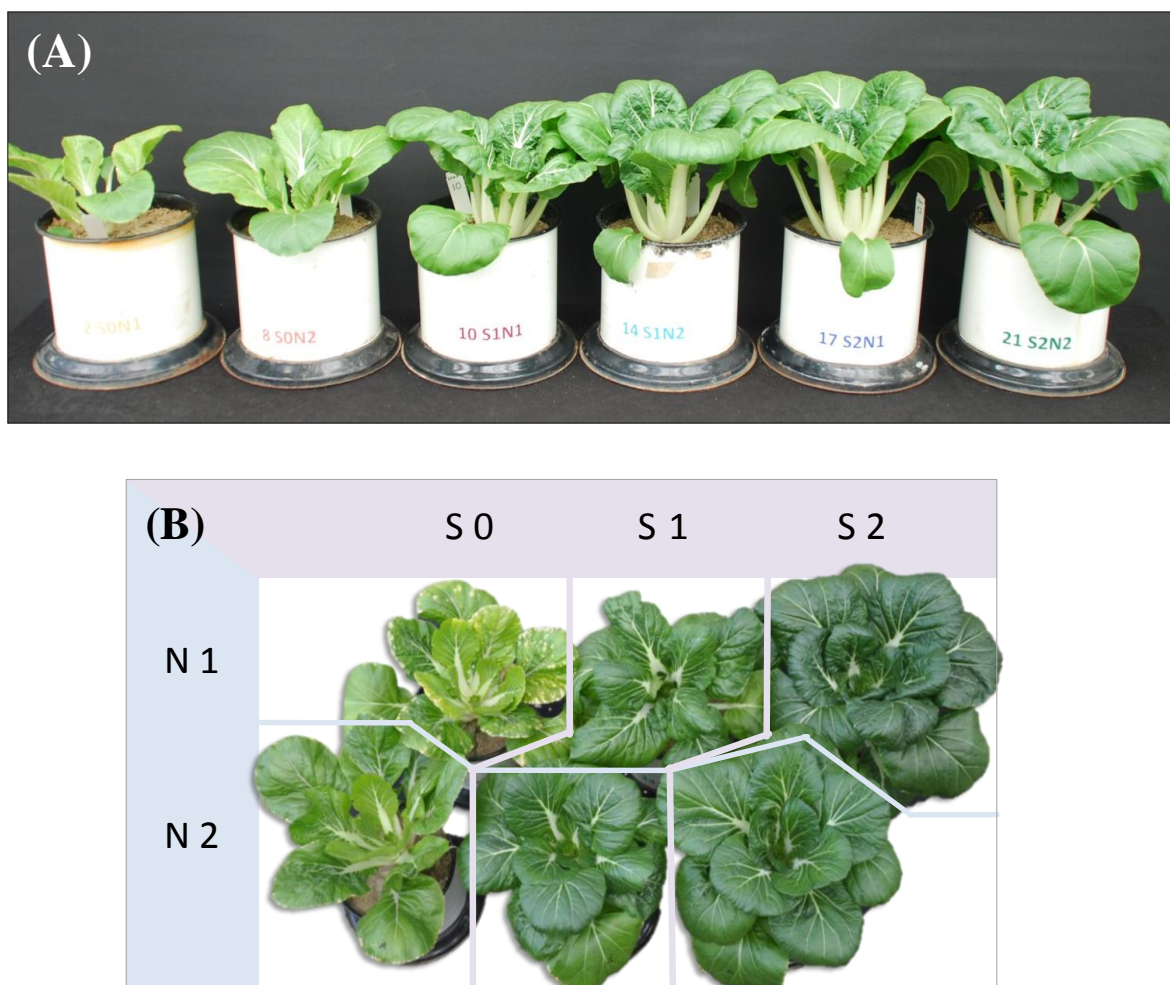


Abb. 4-1: Entwicklung der Biomasse mittels variiertes Stickstoff- und Schwefeldüngung in Pak Choi. (A) Seitenansicht n°2, 8, 10, 14, 17, 21; (B) Oberansicht n°1, 7, 10, 13, 18, 24.

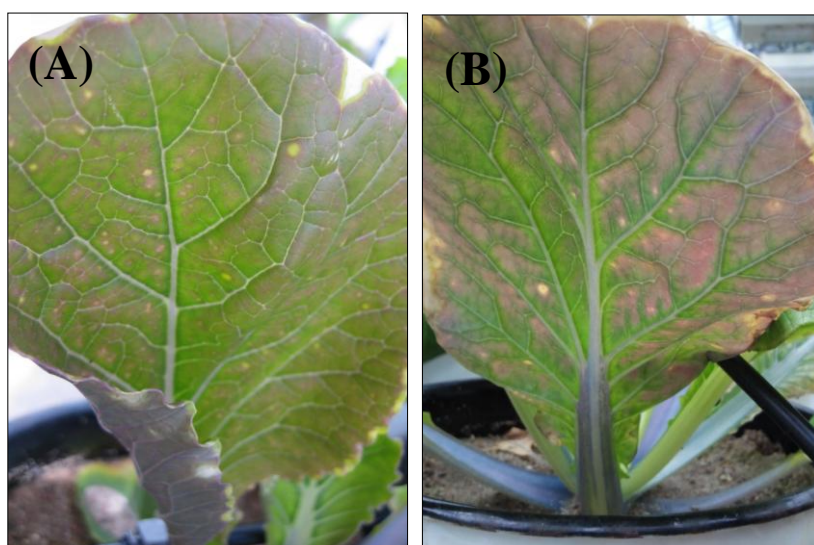


Abb. 4-2: Ausbildung der Symptome in Form von Chlorosen, Nekrosen im intercostalen Bereich und einer Anthocyanfärbung älterer Pak Choi-Blätter unter S-Mangel und 1,5 g N/Gefäß. Das Blatt der Pflanze n°5 aus Versuch V1.3. diente als Exempel und ist von der Vorder- (A) als auch Rückseite (B) dargestellt.

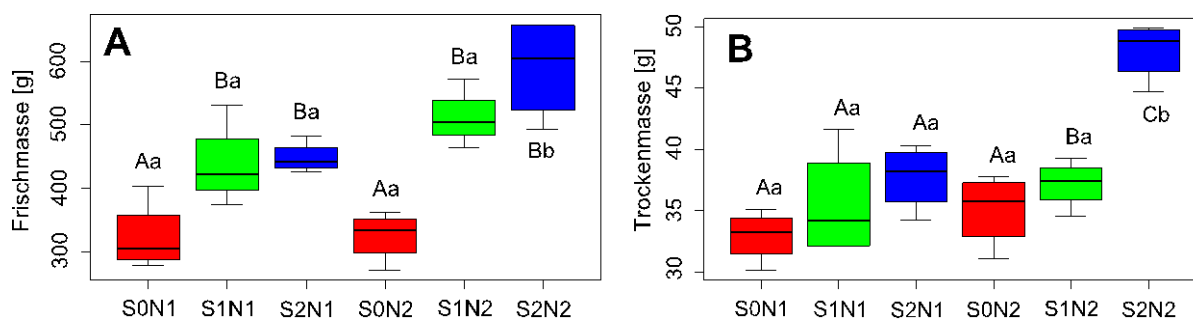


Abb. 4-3: Effekt einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Frisch- (A) und Trockenmasse (B) in Pak Choi. S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

Die SPAD-Analyse wurde zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes durchgeführt, welcher indirekt für den Gesundheitsstatus der Pflanze steht. Für Versuch V1.2. wurde altes mit mittlalem Blattmaterial verglichen. Unter S-Mangel lag der SPAD-Wert im alten Blatt bei 33,74 im mittleren bei 30,39. Mit der höheren N-Düngung lag dieser bei 41,14 und 35,61. Wurde die S-Düngung erhöht lagen diese bei 46,61 und 45,06 (Tab. 4-1). In Versuch V1.3. wurden die SPAD-Werte immer an den gleichen Blättern über einen längeren Wachstumsverlauf gemessen (Tab. 9-6).

Tab. 4-1: SPAD-Werte aus Versuch V1.2. abhängig von Stickstoff-, Schwefeldüngung und der Blattfraktion.

Düngung	Alt			Mittel			MW
	Blatt1	Blatt2	MW	Blatt1	Blatt2	MW	Pflanze
S0N1	35.00	32.48	33.74	34.20	32.20	30.39	32.26
S1N1	40.43	41.30	40.86	46.23	44.55	39.68	43.48
S2N1	41.18	41.93	41.55	48.63	47.35	40.83	45.60
S0N2	40.50	41.78	41.14	37.08	36.18	35.61	36.29
S1N2	44.05	43.88	43.96	47.73	49.50	42.34	46.52
S2N2	47.38	45.85	46.61	50.68	51.63	45.06	49.12

4.1.2 Ergebnisse der N- und S-Düngung auf Stickstoff, Schwefel sowie das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis

Die N-Konzentration in S-Mangelpflanzen lag unter niedrigem N-Niveau bei 2,51%, mit mittlerer S-Gabe bei 2,35%, und 300 mg S/Gefäß bei 2,27% (Tab. 9-7C). Unter dem höheren N-Niveau zeigt sich ein ähnlicher Effekt (S0 = 3,61%, S1 = 3,05%, S2 = 2,79%). Alle Werte des N2-Niveaus unterschieden sich signifikant von N1 (Abb. 4-4A).

Die S-Konzentration lag in S-Mangelpflanzen mit niedriger N-Düngung bei 0,09%, während er mit S1 (0,24%) und S2 stieg (0,48%) (Tab. 9-7C). Zwischen den beiden N-Stufen wurde kein signifikanter Unterschied detektiert (Abb. 4-4B).

Das N/S-Verhältnis verschob sich mit steigender S-Düngung (Abb. 4-4C). Unter niedrigem N-Niveau lag das Verhältnis in S0 bei 27,02, in S1 bei 9,4 und in S2 bei 4,49. Mit N2 war das N/S-Verhältnis unter S0 bei 46,89. Ähnlich verlief das N/S-Verhältnis in den anderen beiden Düngungsstufen S1 (12,92) und S2 (6,47).

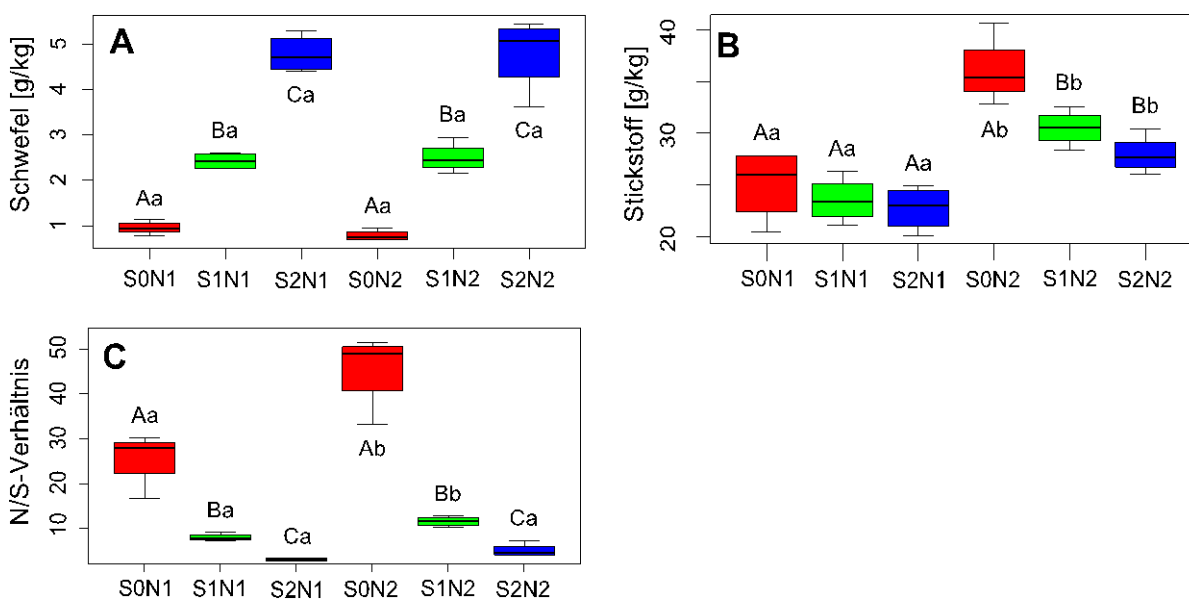


Abb. 4-4: Auswirkung einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Stickstoff- (A) und Schwefel- (B) Konzentration sowie das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (C) in Pak Choi. S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

4.1.3 Ergebnisse der variierten N- und S-Düngung auf Nitrat- und Sulfatgehalt

In der N1-Stufe war kein S-Effekt ersichtlich (Abb. 4-5A). Unter hohen N-Bedingungen lagen die Konzentrationen aufsteigend nach S-Düngung bei 42,28, 51,83 und 21,48 mg/g TM (Tab. 9-7C). Unter S-Mangelbedingungen und N1 lag die Nitrat-Konzentration bei 6,35 mg/g TM. Mit N2 lag die Konzentration bei 42,28 mg/g TM. Dieser Effekt trat ebenfalls in den beiden S-Stufen auf (Abb. 4-5A).

Während die Sulfat-Konzentration in der S-Mangelstufe unter niedriger N-Düngung bei 0,15 mg/g TM lag, stieg sie mit mittlerer S-Gabe (1,14 mg/g TM) und erreichte die Maximalkonzentration (5,09 mg/g TM) infolge von S2 (Tab. 9-7C). Im Hinblick auf die N-Düngung waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 4-5B).

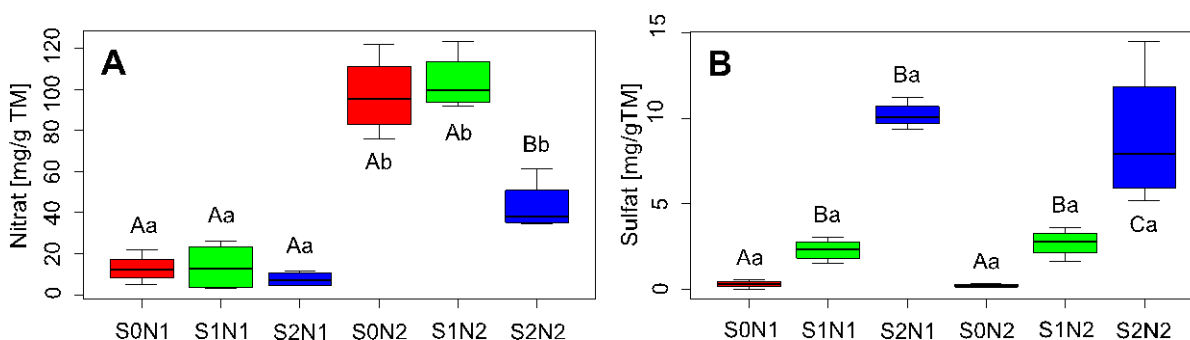


Abb. 4-5: Effekt der variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Nitrat- (A) und Sulfat- (B) Konzentration. S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels Anova mit $p < 0,05$. S-Effekt ist durch Groß-, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

4.1.4 Ergebnisse der Stickstoff- und Schwefeldüngung auf Konzentration und Muster der Glucosinolate in Pak Choi

In Pak Choi wurden mit Hilfe der HPLC-Analyse insgesamt elf verschiedene GLS detektiert (Tab. 4-2): Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M) und Neoglucobrassicin (NGB).

Tab. 4-2: In Pak Choi detektierte Glucosinolate

GLS	Sekundärname	Gruppe	Charakteristika	AS
GI	3-(Methylsulfinyl)-propyl	Alkylthioalkyl (aliphat. Alkyl)	S-haltige Seitenkette	Meth
PRO	2(R)-2-Hydroxy-3-butenyl	aliphat. Alkenyl	Doppelbindung (Alkohol: OH- Seitenkette)	Meth
GRA	4-(Methylsulfinyl)-butyl	Aliphat. Alkyl	S-haltige Seitenkette	Meth
GNP	3-Butenyl	Aliphat. Alkenyl	Doppelbindung (gerade, verzweigte Seitenkette)	Meth
4OH	4-Hydroxyindol-3-ylmethyl	Indol		Tryp
GBC	4-Pentenyl	Olefin (aliphat. Alkenyl)	Doppelbindung (gerade, verzweigte Seitenkette)	Meth
GB	Indol-3-ylmethyl	Indol		Tryp
GNI	2-Phenethyl	Arylalkyl (Aromat)	Ringbildung	Ty, Ph?
GRE	4-Methylsulfinyl-3-butenyl	Alkylthioalkyl (aliphat. Alkyl)	S-haltige Seitenkette	Meth
4M	4-Methoxyindol-3-ylmethyl	Indol		Tryp
NGB	1-Methoxyindol-3-ylmethyl	Indol		Tryp
Aminosäure (AS), Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin(GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), Methionin (Meth), Tryptophan (Tryp), Tyrosin (Ty), Phenylalanin (Ph)				

(modifiziert nach *Fahey et al.*, 2001; *Holst and Williamson*, 2004)

Die Gesamtkonzentration der GLS lag unter N1 im S-Mangelbereich bei 0,44, in S1 bei 2,45 und in S2 bei 7,05 $\mu\text{mol/g TM}$ (Tab. 9-7C). Unter 1,5 g N/Gefäß lag diese bei 0,29, in S1 bei 1,46 und in S2 bei 5,99 $\mu\text{mol/g TM}$. Bezüglich der beiden N-Stufen gab es nur eine statistische Signifikanz in S0, während alle drei S-Stufen sich jeweils signifikant unterschieden (Tab. 9-12, Abb. 4-6A).

Die aliphatischen GLS waren GI, PRO, GRA, GNP, GBC und GRE. Unter niedriger N-Düngung lag die Konzentration der aliphatischen GLS in S0 bei 0,36, in S1 bei 2,03 und in S2 bei 6,23 $\mu\text{mol/g TM}$. Unter N2 lagen sie bei 0,23, 1,15 und 5,05 $\mu\text{mol/g TM}$. In allen S-Stufen lagen statistische Signifikanzen vor (Tab. 9-12). Im S-Mangelbereich wurde ein N-Effekt detektiert, in den höheren S-Stufen nicht. Die GI-Konzentration lag unter niedrigem N-Level in S1 bei 0,03, in S2 bei 0,09 und in S2 bei 0,15 $\mu\text{mol/g TM}$ (Tab. 9-7C). Die Konzentrationen aller S-Stufen hoben sich deutlich voneinander ab. Es herrschte ein S-, kein N- und kein S:N-Effekt (0,07) (Tab. 9-12). Die PRO-Gehalte lagen unter N1 mit

steigender S-Düngung bei 0,06, 0,08 und 0,10 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-7C). Mit höherer N-Gabe war der Gehalt in S0 und S2 dezimiert. Es gab einen S-, N- und S:N-Effekt (Tab. 9-12). Unter dem niedrigeren N-Level lagen die GRA-Gehalte in der S-Mangelstufe bei 0,09, in S1 bei 0,09 und in S2 bei 0,15 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-7C). Unter einem höheren N-Level konnten in S0 und S2 reduzierte GRA-Gehalte nachgewiesen werden (Tab. 9-7C). Der Höchstgehalt wurde in S2N1 erreicht. Es gab einen S-, N- und S:N-Effekt (Tab. 9-12). In N1 lag der GNP-Gehalt bei S0 bei 0,09, bei S1 bei 0,89 und S2 bei 3,05 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-7C). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zu N1 aufgedeckt (Tab. 9-12D). Es herrschte ein deutlicher S- (0,00), ein N- (0,00) und kein S:N-Effekt (0,18) (Tab. 9-12). Die GBC-Gehalte variierten mit N1 (0,04; 0,81; 2,65 $\mu\text{mol/g}$ TM) (Tab. 9-7C). Unter N2 lagen diese bei 0,03, 0,37 und 2,22 $\mu\text{mol/g}$ TM. Es wurde ein S- (0,00), kein N- (0,51) und kein interaktiver S:N-Effekt (0,06) aufgedeckt (Tab. 9-12). Unter N1 lag die GRE-Konzentration bei 0,001, in S1 bei 0,02 und in S2 bei 0,06 $\mu\text{mol/g}$ TM (Abb. 5-7I). Bei 1,5 g N/Gefäß lagen diese bei 0,001, 0,007 und 0,042 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-7C). Es existierte ein S-, kein N- und ein S:N-Effekt (Tab. 9-12).

Als einziges aromatisches GLS wurde GNI detektiert. S-Mangelpflanzen wiesen 0,023 μmol GNI/g TM auf. In S1 waren es 0,21 und in S2 0,42 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10C). Dabei sind alle drei S-Stufen voneinander signifikant verschieden (Abb. 4-7C). Unter der N2 lagen die Konzentrationen in S0 bei 0,01, in S1 bei 0,11 und S2 bei 0,33 $\mu\text{mol/g}$ TM. Es gab einen S- (0,00), einen N- (0,02) und einen interaktiven S:N-Effekt auf GNI (0,02) (Tab. 9-12).

Vier indolische GLS wurden detektiert: 4OH, GB, 4M und NGB. Unter N1 lag die Konzentration aller indolischer GLS in den S-Stufen bei 0,07, 0,22 und 0,40 $\mu\text{mol/g}$ TM. Wurde die Düngung auf 1,5 g N/Gefäß erhöht, so lag die Konzentration in S0 bei 0,01 $\mu\text{mol/g}$ TM, in S1 bei 0,20 und in S2 bei 0,60 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10C).

Die Konzentration des 4OH lag in S0N1 bei 0,001, in S1N1 bei 0,009 und in der höchsten Stufe bei 0,014 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10C). Zudem waren die Gehalte in S0N2 höher als unter niedrigem N-Niveau (Abb. 4-7E). Es existierte ein S-, kein N- und kein S:N-Effekt (Tab. 9-12). Mit N1 lagen die GB-Gehalte in S0 bei 0,004, in S1 bei 0,05 und in S2 bei 0,16 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10C). Mit 1,5 g N/Gefäß stieg in S1 und S2 die Konzentration. Es gab einen S- (0,00), keinen N- (0,49) und einen interaktiven S:N-Effekt (0,00) (Tab. 9-12). Die 4M-Konzentration lag unter N1-Gabe in S0 bei 0,04, in S1 bei 0,09 und in S2- bei 0,13 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10). Mit erhöhter N-Gabe wurde kein signifikanter Unterschied ausgemacht (Abb. 4-7G). Es gab einen S-Effekt (0,00), keinen N-Effekt (0,08) und keinen S:N-Effekt (0,15) auf 4M (Tab. 9-12). Unter N1 lag die NGB-Konzentration in S-

Mangelpflanzen bei 0,02, in S1 bei 0,07 und in S2 bei 0,10 $\mu\text{mol/g}$ TM. Das höhere N-Niveau führte in S0 zu 0,02, in S1 zu 0,05 und in S2 zu 0,13 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-10C, Abb. 4-7H). Es ergab sich ein S- (0,00), kein N- (0,18) und kein S:N-Effekt (0,13) (Tab. 9-12).

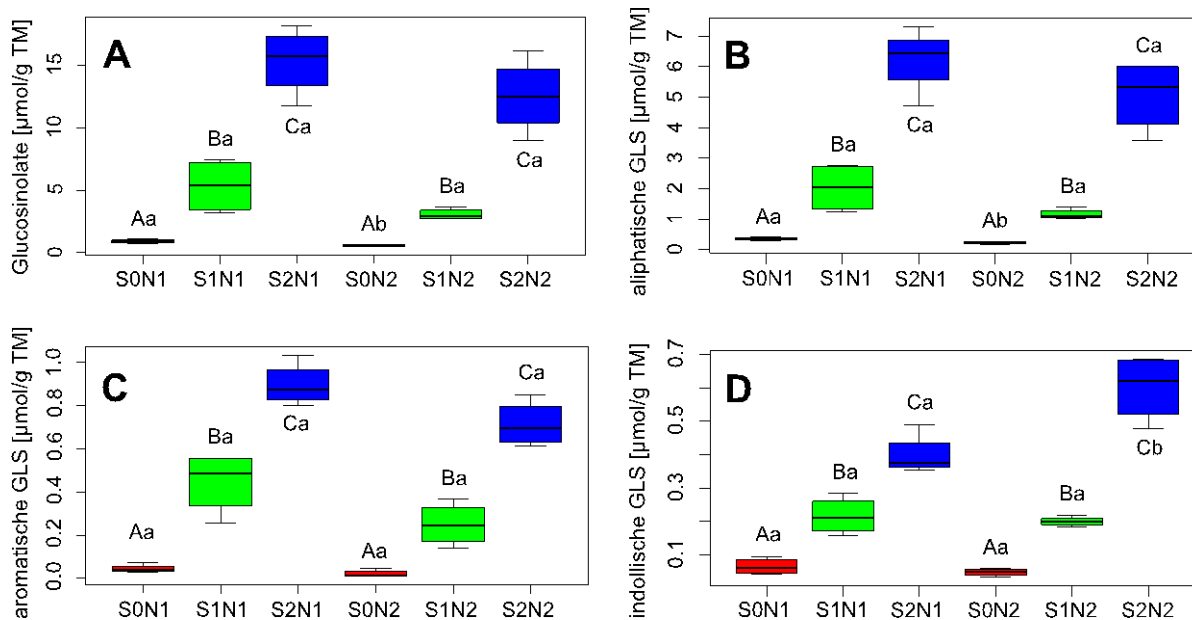


Abb. 4-6: Auswirkungen einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die Gesamtkonzentration der Glucosinolate (A) und deren Einteilung in aliphatisch (B), aromatisch (C) und indolisch (D). S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

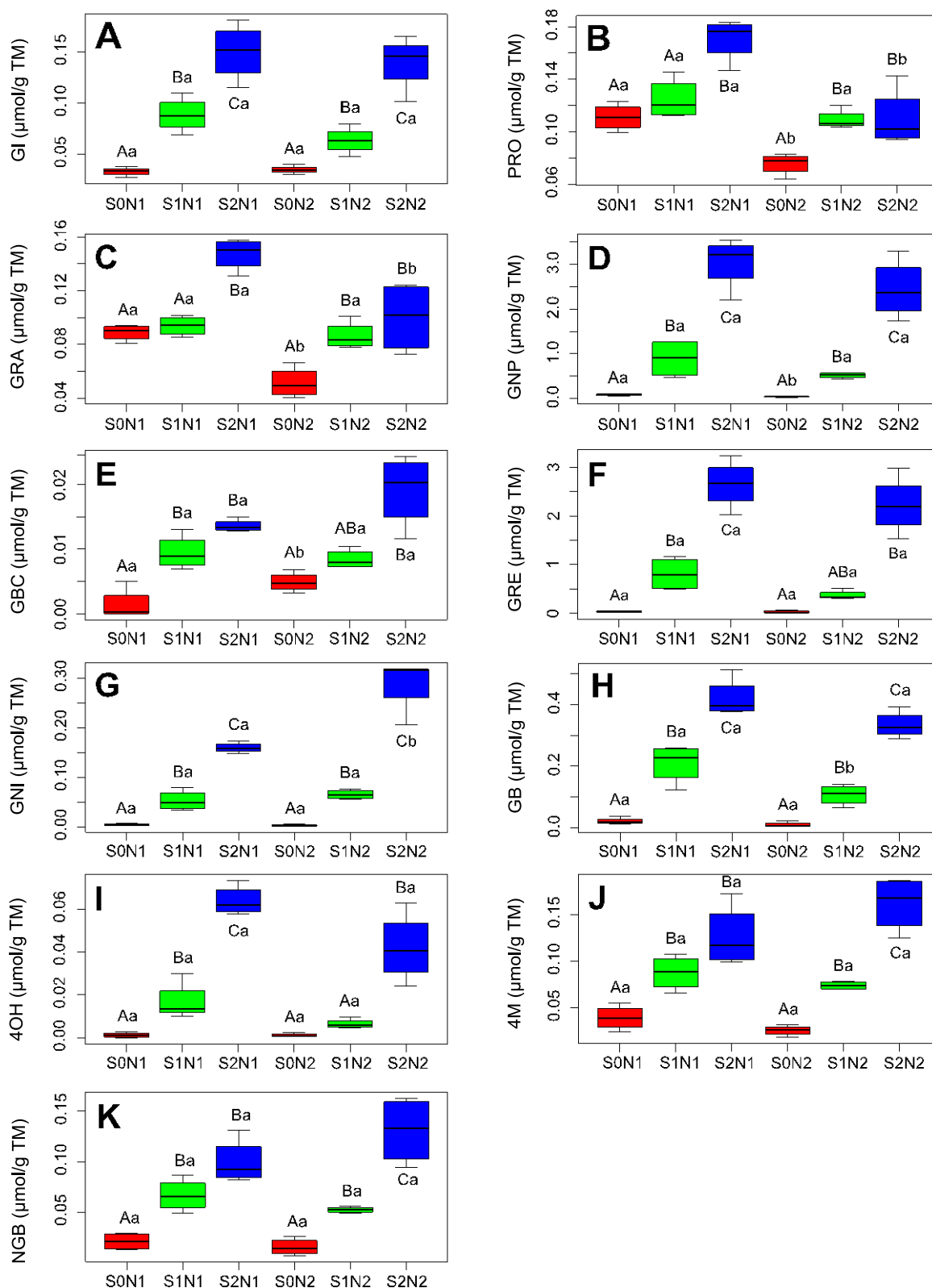


Abb. 4-7: Effekt der Stickstoff- und Schwefeldüngung auf individuelle Glucosinolate in Pak Choi. S0, S1, S2 = 0, 60, 300 mg S/Gefäß; N1, N2 = 0,75, 1,5 g N/Gefäß; Anova ($p < 0,05$), S-Effekt in Groß-, N-Effekt in Kleinbuchstaben. A = Glucoiberin (GI), B = Progoitrin (PRO), C = Glucoraphanin (GRA), D = Gluconapin (GNP), E = 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), F = Glucobrassicinapin (GBC), G = Glucobrassicin (GB), H = Gluconasturtiin (GNI), I = Glucoraphenin (GRE), J = 4-Methoxyglucobrassicin (4M), K = Neoglucobrassicin (NGB).

4.1.5 Ergebnisse einer variierten Stickstoff- und Schwefel-Düngung auf Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Pak Choi

Die Gesamtkonzentrationen der GLS-HP lag in beiden S-Mangelstufen unter N1 und N2 durchweg bei 0 $\mu\text{mol/g}$ FM (Tab. 9-10A). In N1 lag die Konzentration in S1 bei 0,67 und in S2 bei 1,22 $\mu\text{mol/g}$ FM, unter höherem N-Niveau lag die Konzentration bei 0,41 und 1,14 $\mu\text{mol/g}$ FM. Sowohl unter N1 als auch N2 unterschieden sich alle drei S-Stufen signifikant voneinander. Es existierte ein S-, kein N- (0,17) und kein S:N-Effekt (Tab. 9-12).

Im frischen Pflanzenmaterial konnten acht verschiedene GLS-HP detektiert werden: 2-Phenylethyl-Isothiocyanat (2PEITC), 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates (Epi 3But), 2-Phenylethylcyanid (2PECN), Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent), Indolacetonitril (IACN) und 4-Pentenylcyanid (4Pent-CN). Nach Einteilung der GLS-HP wurden drei ITC (3But-ITC, 4Pent-ITC und 2PEITC), drei Nitrile (4Pent-CN, 2PECN und IACN) und zwei Epithionitrile (Epi 3But und Epi 4Pent) im Pflanzenmaterial detektiert (Abb. 4-10).

Die ITC-Konzentration lag unter N1 bei 0,04 in S1 und 0,12 $\mu\text{mol/g}$ FM in S2. Unter höherem N-Niveau lag sie bei 0,01 und 0,07 $\mu\text{mol/g}$ FM (Tab. 9-10). Ein S-Effekt lag nur in S2N1 vor (B). Das 2PEITC konnte mit S1 unter N1 und N2 nicht signifikant gesteigert werden (0,010 $\mu\text{mol/g}$ FM) (Abb. 4-10A). Nur S2 unterschied sich signifikant sowohl in N1 als auch N2. Unter höherem N-Niveau lag die Konzentration in S1 bei 0,003 und in S2 bei 0,012 $\mu\text{mol/g}$ FM. Es gab einen S-, aber keinen N- und S:N-Effekt (Tab. 9-10B, Tab. 9-12). Die Konzentration des 3But-ITC lag unter niedrigem N-Niveau in S1 bei 0,013 und in S2 bei 0,038 $\mu\text{mol/g}$ FM (Abb. 4-10B). Diese unterschieden sich nicht von S0. Unter höherem N-Niveau waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 4-10B, Tab. 9-12). Das 4Pent-ITC wurde unter S-Mangel nicht detektiert und stieg nicht signifikant mit S1 (0,012 $\mu\text{mol/g}$ FM) (Tab. 9-10, Tab. 9-12). In S2 stieg 4Pent-ITC signifikant (0,070 $\mu\text{mol/g}$ FM). In S2N2 war die Konzentration bezüglich des S-Effektes höher, aber infolge des N-Effektes verglichen mit N1 reduziert (0,039 $\mu\text{mol/g}$ FM) (Tab. 9-10).

Die Konzentration der Nitrile lag in S0 sowohl unter N1 als auch unter N2 bei 0 $\mu\text{mol/g}$ FM. Unter der niedrigen N-Düngung lag die Nitril-Konzentration in S1 bei 0,128 und in S2 bei 0,169 $\mu\text{mol/g}$ FM (Tab. 9-10). Unter höherem N-Niveau lag sie in S1 bei 0,100 bzw. in S2 bei 0,182 $\mu\text{mol/g}$ FM. Alle S-Stufen unterschieden sich signifikant, ein N- und S:N-Effekt existierten nicht (Tab. 9-12, Abb. 4-10C).

Das 2PECN lag in N1 und S1 bei 0,03 und in S2 bei 0,04 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-10). Durch N2 lag die Konzentration in bei 0,02 und 0,05 $\mu\text{mol/g FM}$, welche sich signifikant unterschieden (Tab. 9-10). N2 führte zu einem S- aber keinen N-Effekt (Tab. 9-12). Es lag ein S-, kein N- (0,21) und kein S:N-Effekt (0,41) vor (Tab. 9-12). Das 4Pent-CN stieg unter N1 und N2 in drei Etappen infolge der S-Düngung an (Tab. 9-10). Unter N1 lagen die Konzentrationen bei 0,0,89 und 0,13 $\mu\text{mol/g FM}$, unter hohem N-Niveau bei 0,08 und 0,13 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-10). Es existierte ein S, kein N- (0,20) und kein S:N-Effekt (0,32) (Tab. 9-12). IACN lag unter niedrigem N-Niveau in S1 bei 0,004 und S2 bei 0,004 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-10, Abb. 4-10H). Unter N2 stieg die Konzentration signifikant und stufenweise an (H). Ein S-, kein N- (0,11) und ein S:N-Effekt lagen vor (Tab. 9-12).

Die Konzentration der Epithionitrile lag in beiden S0-Stufen bei 0 $\mu\text{mol/g FM}$. Unter N1 lag die Konzentration in S1 bei 0,51 und in S2 bei 0,93 $\mu\text{mol/g FM}$. Unter N2 lag sie bei 0,30 und 0,89 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-10C). In N1 lag durchgehend ein S-Effekt, in N2 unterschied sich nur S2. Ein N-Effekt lag nicht vor (Abb. 4-10D, Tab. 9-12). Die Epi 3But-Konzentration wurde durch gesteigerte S-Düngung in N1 stufenweise erhöht (0,28 und 0,46 $\mu\text{mol/g FM}$) (F). Eine gesteigerte N-Düngung führte bezüglich der S-Steigung nur mit der höchsten S-Stufe zu höheren Konzentrationen (0,44 $\mu\text{mol/g FM}$). Es gab einen S-, keinen N- und keinen S:N-Effekt (Tab. 9-12). Epi 4Pent stieg signifikant unter N1 mit jeder S-Düngung von 0,23 auf 0,47 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-10). Unter N2 führte nur S2 zu signifikanten Konzentrationen (Abb. 4-10G). Es gab einen S-, keinen N- und S:N-Effekt (0,54) (Tab. 9-12).

Das ITC/Nitril-Verhältnis lag in beiden S-Mangelbereichen bei 0. Mit S1N1 stieg sie auf 0,25 und N1S2 signifikant auf 0,70 (Tab. 9-10, Tab. 9-12). Unter dem höheren N-Niveau lag das Verhältnis in S1 bei 0,09 und in S2 (signifikant von S0) bei 0,38. Es gab einen S- und keinen N-Effekt (Abb. 4-9A, Tab. 9-12).

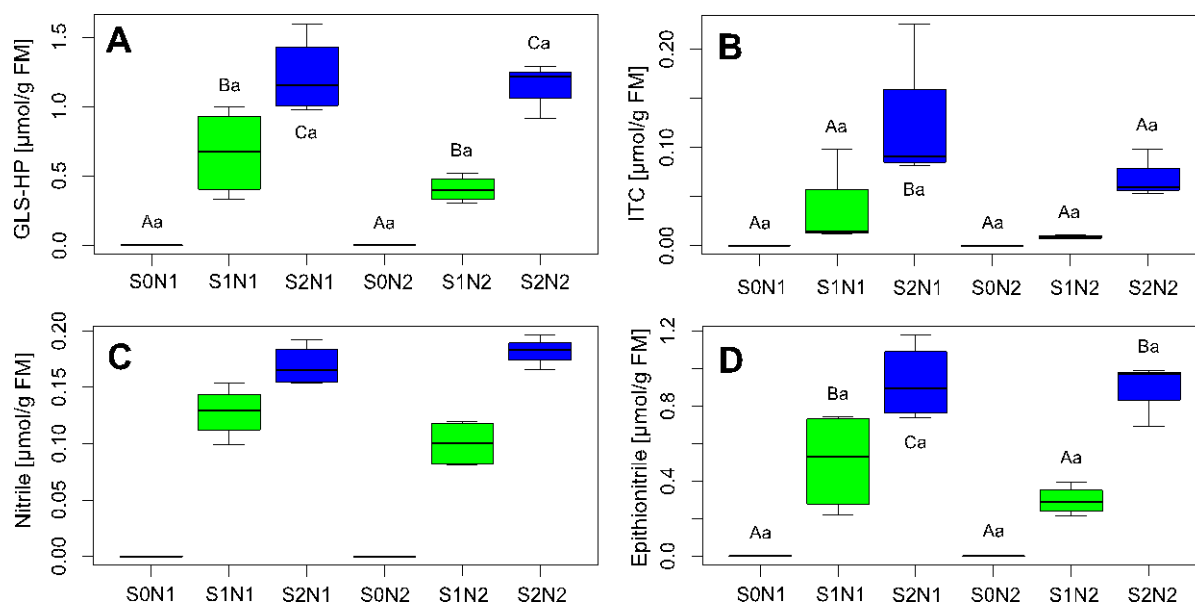


Abb. 4-8: Auswirkungen einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die Gesamtkonzentration der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte (A) und deren Einteilung in Isothiocyanate (ITC) (B), Nitrile (C) und Epithionitrile (D). S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

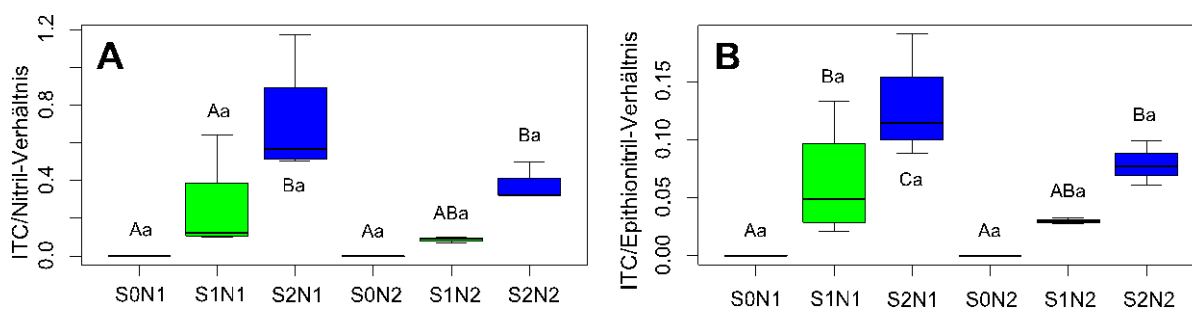


Abb. 4-9: Einfluss einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf das Isothiocyanat/Nitril-Verhältnis (A) sowie Isothiocyanat/Epithionitril-Verhältnis (B) in Pak Choi. S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils über bzw. unter den Boxplots gekennzeichnet.

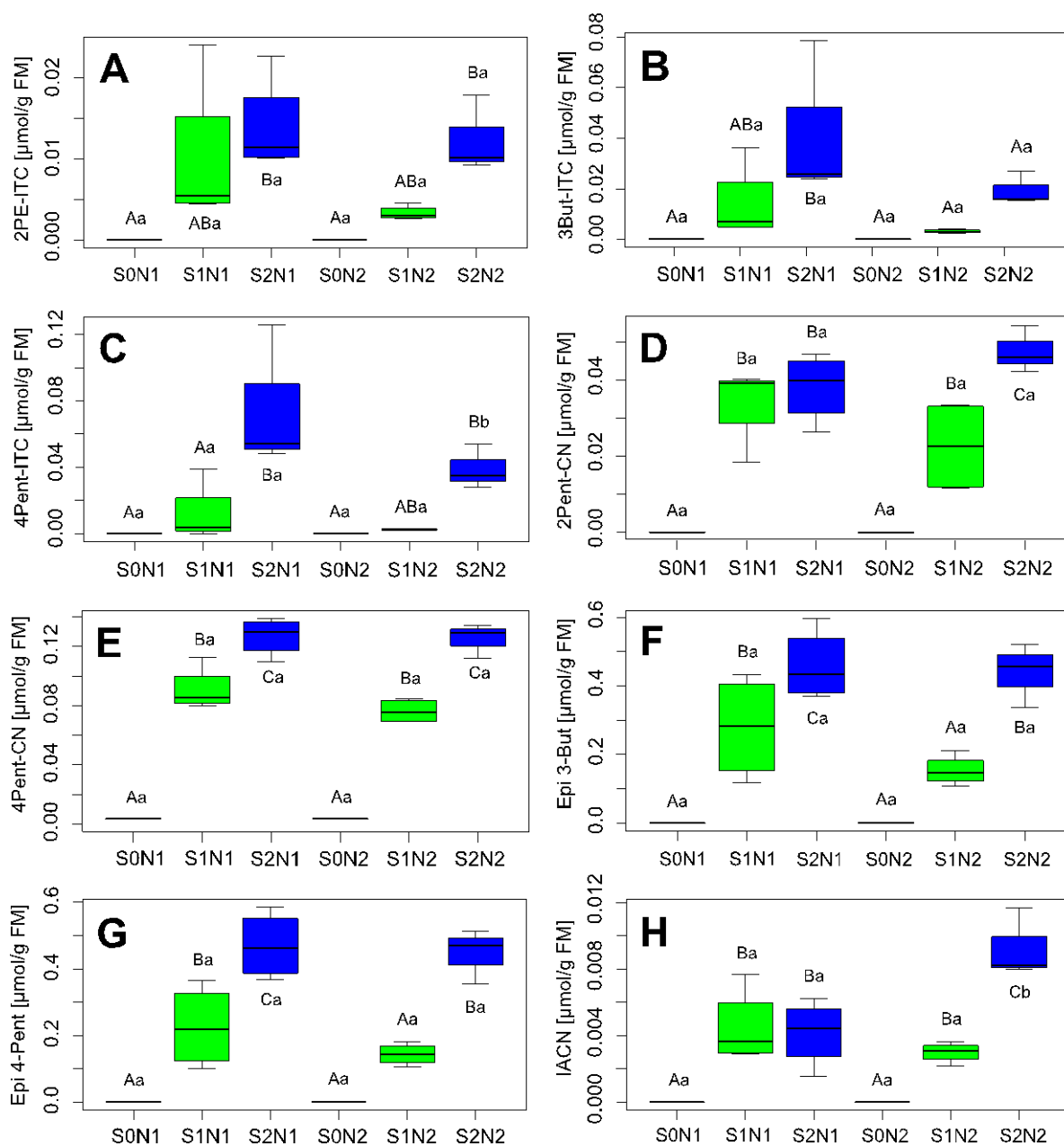


Abb. 4-10: Individuelle Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in mit Stickstoff und Schwefel gedüngten Pak Choi Pflanzen. S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß; statistische Auswertung mittels einer Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt ist durch Großbuchstaben, N-Effekt durch Kleinbuchstaben jeweils an den Boxplots gekennzeichnet. A = 2-Phenylethyl-Isothiocyanat (2PE-ITC), B = 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), C = 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), D = 2-Phenylethyl-Cyanid (2PE-CN), E = 4-Pentenyl-Cyanid (4Pent-CN), F = Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolats (Epi 3But), G = Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent), H = Indolacetonitril (IACN).

4.2 Ergebnisse des Selen-Experimentes: Auswirkungen einer Selen-Blattapplikation auf einzelne Parameter in Pak Choi

4.2.1 Frisch- und Trockenmasse in Pak Choi infolge einer Selenblattapplikation unterschiedlicher Konzentrationen

Die FM lag in der Se-Kontrolle (S0) bei 413,16 g, und setzte sich mit steigender Se-Blattapplikation fort auf 489,72 g, 600,08 g, 461,95 g und letztendlich 427,55 g (Abb. 4-11A). Statistisch signifikant unterschied sich die Behandlungsstufe Se2 von den allen anderen Se-Applikationsstufen (Abb. 4-11A). Die Se-Signifikanz lag bei 0,0001 (Tab. 9-16). Die TM lag in den einzelnen Behandlungsstufen bei 35,46 g, 38,13 g, 41,43 g, 33,58 g und 32,98 g (Abb. 4-11B). Hier lag eine statistische Signifikanz in der dritten Behandlungsstufe zu den letzten Stufen Se3 und Se4 vor, zur Kontrolle und der Se-Stufe 1 lag keine Signifikanz vor. Die Se-Effekt lag hier bei 0,0035 (Tab. 9-16).

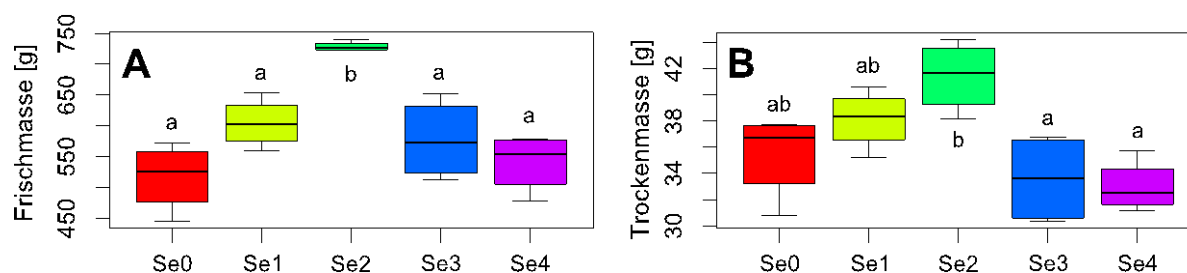


Abb. 4-11: Entwicklung der Frischmasse (A) und Trockenmasse (B) mittels einer gesteigerten Selen-Konzentration über Blattapplikation in Pak Choi. Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze, statistische Auswertung mittels Anova mit $p < 0,05$, Se-Effekt ist in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

4.2.2 Ergebnisse einer Se-Blattapplikation auf in Pak Choi analysiertem Stickstoff, Schwefel, Stickstoff/Schwefel-Verhältnis und Selen

Der N-Gehalt lag in den jeweiligen Se-Blattapplikationsstufen bei 3,43, 3,45, 3,47, 3,56 und 3,49%. Der Se-Effekt zeigte einen statistischen Wert von 0,82 (Tab. 9-16).

Die S-Konzentration variierte mit gesteigerter Konzentration der Se-Blattapplikation (Se0 = 0,62%, Se1 = 0,75%, Se2 = 0,75%, Se3 = 1,17%, Se4 = 1,05%). Die statistische Auswertung lieferte eine Signifikanz von $5,033 \cdot 10^{-6}$ (Tab. 9-16).

Das N/S-Verhältnis variierte durch die Se-Düngung (Se0 = 5,52, Se1 = 4,62, Se2 = 4,70, Se3 = 3,08, Se4 = 3,37). Die statistische Signifikanz lag bei $1,03 \cdot 10^{-7}$ (Tab. 9-16).

Die Se-Konzentration lag in der Kontrolle bei durchschnittlich 0,14 mg/ kg TM, in Se1 bei 7,83, in Se2 bei 25,83, in Se3 bei 324,75 und in der höchsten Se-Stufe bei 442,00 mg Se/kg TM. Signifikant unterschieden sich dabei Se3 und Se4 von allen anderen Stufen. Der Se-Effekt lag hier bei $1,63 \cdot 10^{-10}$ (Tab. 9-16).

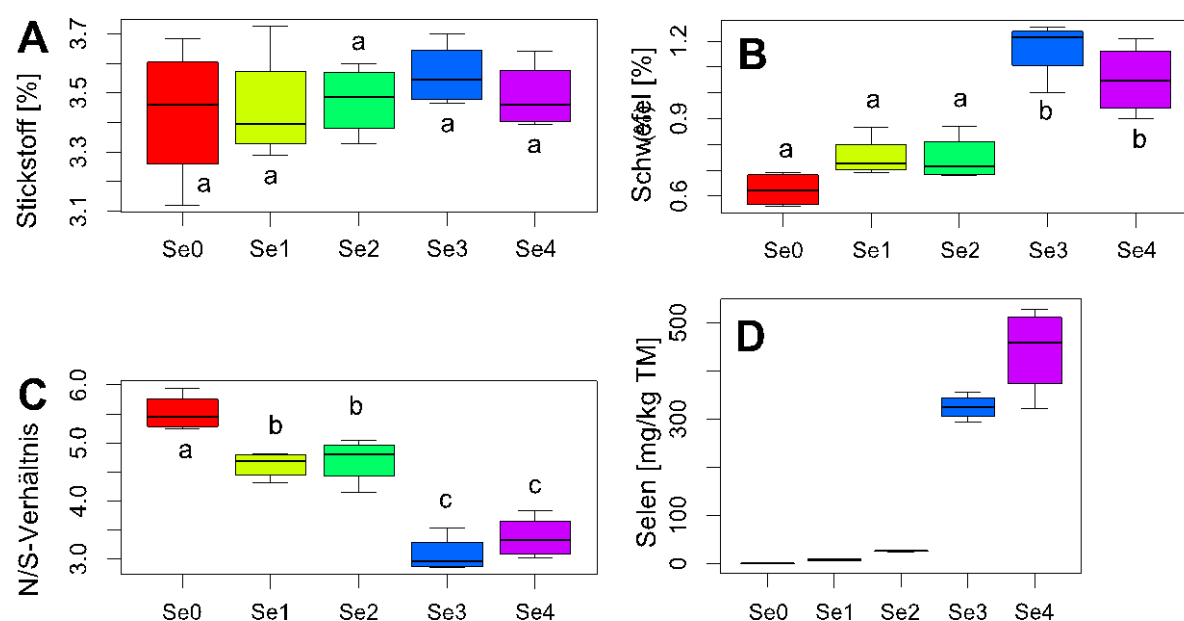


Abb. 4-12: Stickstoff (A), Schwefel (B), das Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (C) und Selen (D) in mit unterschiedlichen Se-Konzentrationen behandelten Pak Choi-Pflanzen. Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze, statistische Auswertung mittels Anova mit $p < 0,05$, Se-Effekt ist in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

4.2.3 Detektierte Glucosinolate in Selen-blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen

Die Gesamtkonzentration der GLS lag in der Se-Kontrolle bei durchschnittlich 0,23 $\mu\text{mol/g}$ TM. In den folgenden Stufen lag sie bei 0,27, 0,25, 0,22 und 0,29 (Tab. 9-16A). Es wurde keine statistische Signifikanz erfasst (Tab. 9-16, Tab. 9-16).

Die aliphatischen, aromatischen und indolischen GLS variierten allesamt in einem Bereich von 3,31–4,36, 0,36–0,47 und 1,11–1,68 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-16). Es lag keine statistisch Signifikanz vor (Abb. 4-13B, C, D, Tab. 9-16).

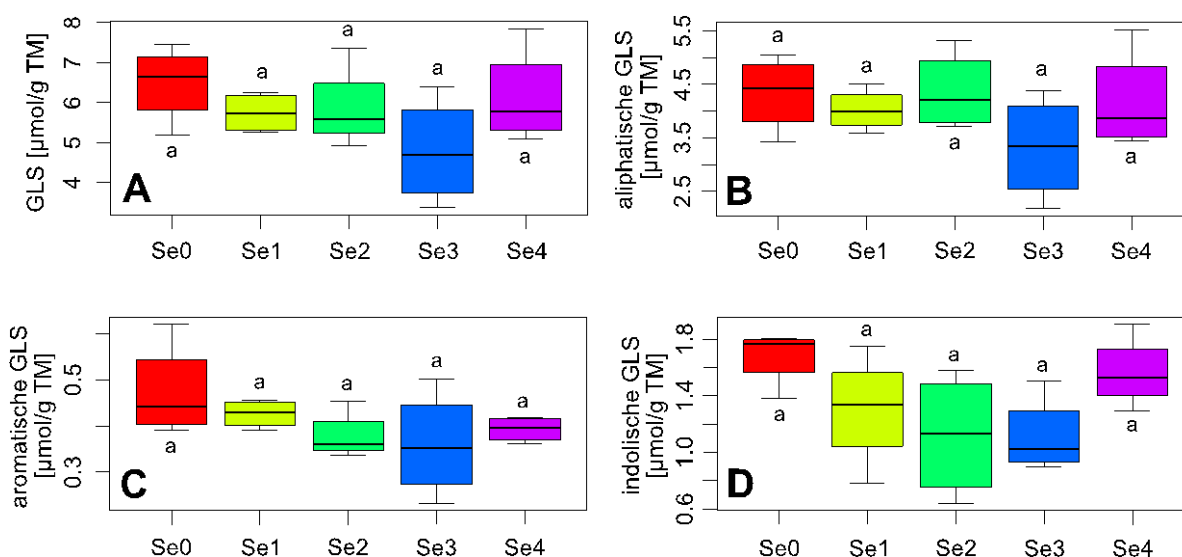


Abb. 4-13: Beeinflussung der Se-Blattapplikation (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze) auf Gesamtgehalt (A), aliphatische (B), aromatische (C) und indolische (D) Glucosinolate. Auswertung mittels Anova mit $p < 0,05$, Se-Effekt ist in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

Die individuellen GLS wiesen keine statistischen Signifikanzen hinsichtlich einer Se-Blattapplikation auf (Tab. 9-16). Eine Ausnahme sind 4OH und GB (Abb. 4-14E, G). Die Konzentration des 4OH lag in Se0 bei 0,27, in Se1 bei 0,17, in Se2 bei 0,17, in Se3 bei 0,12 und in Se4 bei 0,16 $\mu\text{mol/g}$ TM (Tab. 9-16, Tab. 9-16). Der Se-Effekt besaß eine statistische Signifikanz von 0,02. Die GB-Konzentration lag im Se-Kontrollbereich bei 0,896 und veränderte sich teils signifikant mit applizierter Se-Lösung auf 0,64, 0,47, 0,52 und 0,81 $\mu\text{mol/g}$ TM mit einer Signifikanz von 0,025 (Tab. 9-16).

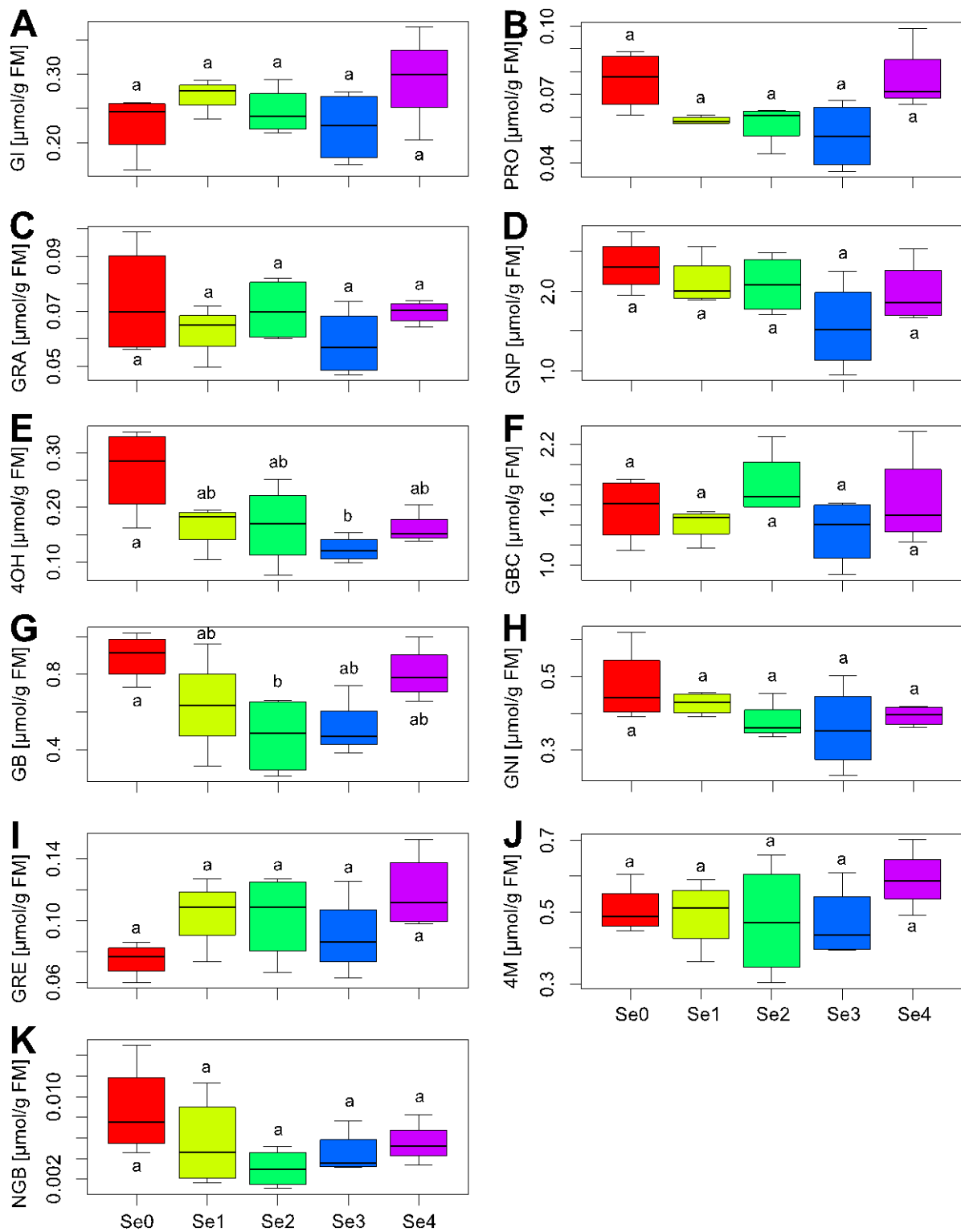


Abb. 4-14: Einfluss einer Se-Blattapplikation in verschiedenen Konzentrationen (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze) auf die individuellen Glucosinolats in Pak Choi. A = Glucoiberin (GI), B = Progoitrin (PRO), C = Glucoraphanin (GRA), D = Gluconapin (GNP), E = 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), F = Glucobrassicinapin (GBC), G = Glucobrassicin (GB), H = Gluconasturtiin (GNI), I = Glucoraphenin (GRE), J = 4-Methoxyglucobrassicin (4M), K = Neoglucobrassicin (NGB); $p < 0,05$, Se-Effekt in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

4.2.4 Detektierte Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in mit Selen-blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen

Die Konzentration der GLS-HP lag abhängig von der applizierten Se-Konzentration bei Se0 = 0,672, Se1 = 1,761, Se2 = 3,407, Se3 = 0,410 und Se4 = 0,527 $\mu\text{mol/g FM}$. Der Se-Effekt lag in diesem Fall bei 0,0002 (Abb. 4-15A, Tab. 9-16). Im Pflanzenmaterial der Pak Choi-Pflanzen wurden insgesamt vier verschiedene GLS-HP detektiert: 3But-, 4Pent-ITC, Epi 3But und Epi 4Pent.

Die Gesamtkonzentration der ITC veränderte sich mit applizierter Konzentration des Spurenelementes von Se0 = 0,122 auf Se1 = 0,374, Se2 = 0,511, Se3 = 0,111 und letztendlich auf Se4 = 0,124 $\mu\text{mol/g FM}$ (Abb. 4-15B) mit einem Se-Effekt von 0,009 (Tab. 9-16). Das 3But-ITC lag in den jeweiligen Konzentrationsstufen der Se-Blattapplikation bei 0,035, 0,110, 0,131, 0,028 und 0,030 $\mu\text{mol/g FM}$ (Abb. 4-16A). Die Konzentrationen in Se1 und Se2 unterschieden sich nicht von der Kontrolle, jedoch von Se3 und Se4 (Tab. 9-16). Der Se-Effekt lag bei 0,007. Die Konzentration des 4Pent-ITC variierte je nach Se-Applikationsstufe (Se0 = 0,087, Se1 = 0,264, Se2 = 0,380, Se3 = 0,083 und Se4 = 0,094 $\mu\text{mol/g FM}$) (Tab. 9-16). Abgesehen von der Konzentration des 4Pent-ITC in Se1 unterschied sich die Konzentration in Se2 signifikant von den anderen Stufen (Abb. 4-16C). Die statistische Signifikanz lag bei 0,011 (Tab. 9-16).

Die Konzentration der Epithionitrile lag in den jeweiligen Se-Applikationsstufen bei 0,550, 1,387, 2,896, 0,298 und 0,403 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-16, Abb. 4-15C). Der Se-Effekt wies eine Signifikanz von 0,0002 auf (Tab. 9-16). Folgende individuelle Epi wurden im Pflanzenmaterial detektiert: Die Konzentration des Epi 3But lag in Se0 bei 0,239 $\mu\text{mol/g FM}$ (Tab. 9-16). Die Konzentration in Se2 unterschied sich mit 1,327 $\mu\text{mol/g FM}$ signifikant von den anderen Stufen (Se1 = 0,673, Se3 = 0,064, Se4 = 0,148 $\mu\text{mol/g FM}$) (Abb. 4-16D, Tab. 9-16). Der Se-Effekt war hoch signifikant (0,0002). Das Pflanzenmaterial enthielt in S0 0,311 $\mu\text{mol Epi 4Pent/g FM}$ (Tab. 9-16). Die Höchstkonzentration wurde in Se2 (1,569 $\mu\text{mol/g FM}$) detektiert, welche sich statistisch von den anderen Stufen unterschied (Abb. 4-16E). In Se1 wurden 0,715, in Se3 0,234 und in Se4 0,255 $\mu\text{mol/g FM}$ detektiert. Der Se-Effekt lag bei 0,0002 (Tab. 9-16).

Das ITC/Epi-Verhältnis änderte sich mit steigender Se-Applikation nicht signifikant und verlief auf einem durchschnittlichem Verhältnis von (Tab. 9-16, Abb. 4-15D).

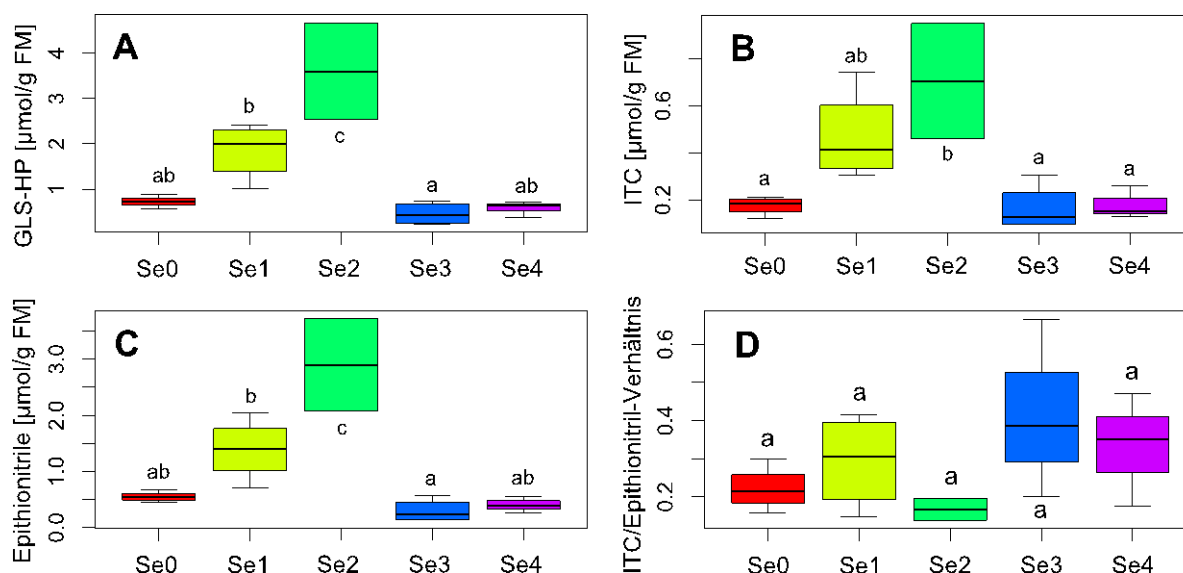


Abb. 4-15: Gesamtkonzentration (A) und Klassifizierung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Isothiocyanate (ITC) (B) und Epithionitrile (Epi) (C) und ITC/Epi-Verhältnis (D) in mit Selen über Blattapplikation behandelten Pak Choi Pflanzen. Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze; Anova mit $p < 0,05$, Se-Effekt in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

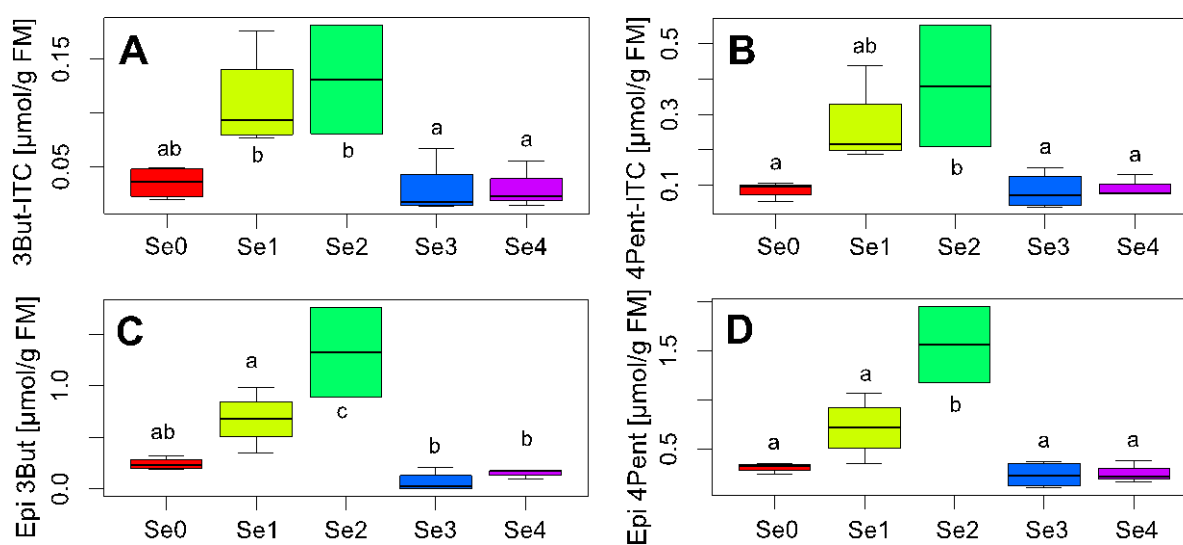


Abb. 4-16: Individuelle Glucosinolat-Hydrolyseprodukte detektiert in mit Selen blattapplizierten Pak Choi-Pflanzen. Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Se/Pflanze; A = 3-Butenyl-Isothiocyanat, B = 4-Pentenyl-Isothiocyanat, C = Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates, D = Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates; Anova mit $p < 0,05$, Se-Effekt in Kleinbuchstaben über bzw. unter den Boxplots angegeben.

5 DISKUSSION

5.1 Effekt variiertes N- und S-Düngung auf diverse Parameter in Pak Choi mit besonderem Fokus auf GLS und GLS-HP

Im ersten Versuchsteil der Arbeit wurde infolge einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung analysiert, inwiefern die GLS und GLS-HP abhängig von der gezielten Düngung gesteuert werden. Besonderer Schwerpunkt war, ob interaktive Düngungseffekte für die Konzentration der SPI relevant waren und ob ein düngungsabhängiges Muster klassifizierter GLS und GLS-HP deutlich wurde. Abhängig von dieser Erkenntnis war es das weiterführende Ziel das ITC/Nitril-Verhältnis in Richtung einer vermehrten Synthese gesundheitsfördernder ITC und einer reduzierten Nitril-Synthese zu optimieren, da letztere in ihrer Wirkung auf den Humanstoffwechsel widersprüchlich sind.

5.1.1 Beeinflussung von Frischmasse, Trockenmasse und Ernährungsstatus der Pflanze infolge der variierten N- und S-Düngung in Pak Choi

Die beiden Düngungsparameter N und S zu variieren, führt zu klassischen Reaktionen der Pflanze sowohl in der Entwicklung und als auch im Wachstum (*Gerendás et al.*, 2009). Infolge der S-Düngung wurde die FM erhöht (Tab. 9-7C, Abb. 4-3A). Während der Anstieg der Biomasse von S0 zu S1 bemerkenswert hoch war, so war die Zunahme von S1 zu S2 weniger stark ausgeprägt. Demnach ist eine Düngung von 60 mg S hinsichtlich der FM bereits ausreichend. Ebenso führte die höhere N-Düngung zu einer deutlich erhöhten FM und bestätigt somit vorherige Analysen unserer Arbeitsgruppe (*Gerendás et al.*, 2009) (Abb. 4-3A). Unter einer höheren N-Zufuhr besteht jedoch die Gefahr eines Verdünnungseffektes aller in der Pflanze enthaltenen Inhaltsstoffe. Diese Verdünnung ist bedingt durch eine Nitratakkumulation und durch am osmotischen Potential beteiligte Kationen. Die Folge ist ein Anstieg in Wassergehalt und FM (Abb. 4-3A), mit jedoch besagtem Verdünnungseffekt (*McIntyre*, 1997). Um solche Verdünnungseffekte überhaupt aufspüren zu können, wurde von *Koricheva* (1999) ein Vektor-Diagramm konzipiert. Diese Methode ermöglicht die graphische Darstellung düngungsspezifischer Effekte auf die Konzentration von Inhaltsstoffen. Die entsprechende Methodik ist im Anhang zu finden (Abb. 9-6). Anhand der Graphik können Effekte einer Synthesereduktion, -steigerung sowie einer Aufkonzentrierung oder Verdünnung visualisiert und interpretiert werden. Nach Datenauswertung des Versuches verdeutlichte die vektorgraphische Darstellung, dass es

unter hoher S- und N-Düngung zu einem leichten Verdünnungseffekt der Inhaltsstoffe kam (Abb. 9-7). Interessanterweise detektierten *Gerendàs et al.* (2008b) einen deutlicheren N-Effekt bezüglich der FM, während hingegen in vorliegender Arbeit der statistisch signifikante S-Effekt mit 0,00 deutlich signifikanter war als der N-Effekt (0,01) (Tab. 9-12). Sowohl S als auch N sind voneinander abhängig, da unter S-Mangel aber hoher N-Düngung die FM gering war (Tab. 9-7C). Diesen Effekt konnte auch die Arbeitsgruppe von *Chen et al.* (2006) in Pak Choi nachweisen. Sobald das S-Angebot erhöht wurde stieg die FM an (Tab. 9-7C, Abb. 4-3A) (*Chen et al.*, 2006). Diese Aussage wird zusätzlich durch den Effekt bestätigt, dass in allen drei Versuchen nur durch die höchste S- und N-Stufe der Höchstgehalt erreicht wurde (Tab. 9-7A, B, C) und nicht, wenn nur einer der Nährstoffe in hoher Konzentration vorlag. Diese Entwicklung erinnert stark an das Optimumsgesetz (*Wollny*, 1887).

Die im Versuch detektierte TM lag bei 32,90–37,72 g. Lediglich in S2N2 wurde ein deutlich höherer Gehalt (48,04 g) detektiert (Tab. 9-7C). Die TM der Sorte *Joi Choi* liegt generell bei 5,47% im Blatt, 2,65% im Strunk und 8,13% in der gesamten Pflanze, welche mit erhöhter Standweite zunimmt (6,0% im Blatt, 3,38% im Stiel, 9,38% in Gesamtpflanze) (*Kallabis-Rippel*, 2000, S. 116; *Lippmann et al.*, 2014). Die im Versuch detektierte TM liegt somit in einem vergleichbaren Bereich (Tab. 9-7A, B, C). Es zeigte sich, dass die höhere N-Düngung nur zu einer höheren TM führte, sobald das S-Niveau hoch war (Abb. 4-3B), wie auch die Arbeitsgruppe von *Omirou et al.* (2012) bekräftigen. Zwecks einer hohen N-Düngung (0,06–1,04 g/Pflanze) stieg die TM in *Eruca sativa*. Wurde die N-Gabe auf 1,49 g erhöht, stieg die TM nicht weiter an (*Omirou et al.*, 2012). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass mit einer höheren N-Gabe als 1,5 g ein steady state level entsteht und die Düngung keinen Effekt mehr auf die TM hat.

Unter S-Mangel wurden die typischen Symptome in jüngeren Blättern in Form von Chlorosen, Nekrosen und hellgrüner aber auch einer Anthocyanfärbung deutlich, die sich insbesondere in den Stielen älterer Blätter manifestierte (Abb. 4-2, Abb. 4-1 A, B) (*Raven et al.*, 2000, S. 793). Die SPAD-Analyse diente zur Kontrolle des Nährstoffstatus der Pflanze (Kapitel 3.4.1). In Versuch V1.2. wurde der SPAD-Wert in alten und mittleren Blättern erfasst. Die jungen Blätter waren teils zu klein bzw. zerbrechlich, um die Analyse daran durchführen zu können. Dennoch zeigte sich die typische Entwicklung: Unter S-Mangel ist unzureichend S für das S-Fe-Cluster des Fd vorhanden (*Raven et al.*, 2000, S. 793). Die Photosynthese ist demnach deutlich reduziert und spiegelt sich in niedrigen SPAD-Werten wider (Tab. 4-1 Tab. 9-6). Entsprechend ist die Nitrat- bzw. Nitritreduktion gestört und es

kommt zur Akkumulation von Nitrat (*Barker and Bryson, 2007, S. 23*). Weiteres zur Entwicklung der Nitratgehalte ist unter Kapitel 4.1.3 beschrieben. Mit höherem N-Angebot waren die SPAD-Werte deutlich erhöht, da unter solchen Bedingungen die Chlorophyllbildung und die vegetative Phase betont ist (*Raven et al., 2000, S. 793*). Dieser Effekt trat in beiden Altersstufen auf, jedoch mit generell niedrigeren Werten in jüngeren Blättern (Tab. 4-1). Um keine Momentaufnahme sondern eine Entwicklung über einen längeren Zeitraum erfassen zu können, wurden in Versuch V1.3. die SPAD-Werte zu mehreren Wachstumsphasen erfasst. In allen Fraktionen stieg zunächst der SPAD-Wert an, um ab dem 05.06. im alten Blattmaterial zu sinken – und dies düngungsunabhängig (Tab. 4-1). Blätter mittlerem Alters wiesen erst einige Tage später (09.06., 55 Tage nach Anzucht) sinkende SPAD-Werte auf (Tab. 4-1). Mit fortgeschrittenem Alter wachsen neue Blätter in der Pflanze nach und die ersten seneszenten Anzeichen zeigen sich im alten Blattmaterial: Mit zunehmendem Alter wird z.B. der N-Gehalt durch eine effizientere N-Assimilation herabgesetzt (*Smith and Loneragan, 1997, S. 3–33*). Somit kann bestätigt werden, dass im alten Blattmaterial die Nährstoffkonzentration und somit alle damit verbundenen Prozesse (Photosynthese, Chlorophyllbildung etc.) reduziert waren. Zudem wiesen die Versuchspflanzen mit höherer Nährstoffkonzentration durchgehend höhere SPAD-Werte auf (Tab. 4-1, Tab. 9-6).

5.1.2 Auswirkung einer variierten Stickstoff- und Schwefeldüngung auf die N und S-Konzentration sowie das N/S-Verhältnis in Pak Choi

Die Analyse der Makronährstoffe ist im Fall dieser Versuchsfrage unabdingbar, denn um eine Aussage über den N- und S-Effekt auf sekundäre Inhaltsstoffe treffen zu können, muss sichergestellt werden, dass diese tatsächlich von der Pflanze aufgenommen wurden. Dies wurde mittels einer Elementaranalyse kontrolliert.

Die Versuchsergebnisse bestätigen, dass der zugeführte N-Dünger von der Pflanze aufgenommen wurde (Abb. 4-4A). Zum anderen zeigte sich eine Entwicklung zu höheren Gehalten in N₂ als in N₁ (Tab. 9-7C, Abb. 4-4A). Diese Änderung kann zudem mit den Versuchen V1.1. und V1.2. bestätigt werden (Tab. 9-7A, B). Eine ausreichende N-Ernährung spiegelt sich rasch in einer sichtbaren Dunkelfärbung der Blätter, infolge einer verstärkten Chlorophyllbildung und Betonung der vegetativen Phase (*Raven et al., 2000, S. 793*) (Tab. 4-1, Tab. 9-6, Abb. 4-1B). Eine Bonitierung der Pflanzen sowie die SPAD-

Analyse bestätigt den beschriebenen Effekt (Tab. 4-1, Tab. 9-5, Tab. 9-6). Da NH_4^+ Ausgangssubstrat der AS-Synthese ist (Abb. 9-2), ist die Synthese N-haltiger und proteinogener Bestandteile (z.B. AS, Proteine, Chlorophyll) unter N-Mangel reduziert und wird begünstigt sobald mehr N gedüngt wird (Amberger, 1996, S. 185). Insbesondere in Versuch V1.2. und V1.3. wurde der N-Gehalt in der Pflanze reduziert, sobald mehr S gedüngt wurde (Tab. 9-7B, C). In V1.1. gab es keinen S-Effekt (Tab. 9-7A). Der Grund ist nicht eine N-Reduktion durch eine höhere S-Düngung. Vielmehr kann mit hoher N-Düngung ein Verdünnungseffekt hervorgerufen worden sein (Gerendás et al., 2008b), da vermehrt Biomasse ausgebildet wurde (Abb. 4-1 A, B, Tab. 9-7) (Smith and Loneragan, 1997). Zudem sind im alten Pflanzenmaterial die N-Gehalte durch eine effizientere Assimilation reduziert (Smith and Loneragan, 1997, S. 3–33). Mehr zu diesem Effekt und ob eine Verdünnung der Inhaltsstoffe tatsächlich im Versuch stattfand ist unter Kapitel 5.1.5 zu lesen.

Der durchschnittliche N-Gehalt liegt in *Brassica*-Pflanzen bei 2,0% und in -Samen bei 3,5% (Amberger, 1996, S. 177). Im Versuch wurden Konzentrationen von 2,3–3,6% ermittelt (Tab. 9-7C), die somit im Optimalbereich liegen. Speziell für die Sorte *Joi Choi* sind die Gehalte im Blatt (1–6%) durchschnittlich höher als im Stiel (1–4%) (Kallabis-Rippel, 2000, S. 199), wie auch in Versuch V1.1. bestätigt wurde (Tab. 9-11). Hier wurde das Pflanzenmaterial, neben altem und jungem Blatt, nach Blattspreite und Stiel differenziert. Demzufolge spielt auch die Fraktionierung der Pflanzen eine zentrale Rolle. Der als Mangel bezeichnete kritische N-Gehalt liegt in voll expandierten aber noch nicht seneszenten Blättern bei 1,5% (Amberger, 1996, S. 185). Im Versuch akkumulierten die Pflanzen bereits in N1 ausreichend N (Tab. 9-7C) und unterlagen somit keinem N-Mangel.

Wie erwartet wurde durch die gestaffelte S-Düngung die S-Konzentration im Pflanzenmaterial erhöht (Abb. 4-4B). Unter S-Mangel und moderater N-Düngung traten die typischen Mangelsymptome auf (Abb. 4-2). Diese werden verstärkt, sobald N erhöht wird, wie auch im Versuch deutlich wurde (Abb. 4-1A, B). Der Effekt kann anhand der SPAD-Analyse bekräftigt werden, denn unter S-Mangel und der niedrigeren N-Zufuhr waren die SPAD-Werte stets niedrig, stiegen jedoch mit gesteigerter N-Düngung an (Tab. 4-1, Tab. 9-6). Zudem konnte dieser Effekt in einem N-Spät düngungsversuch auf S-Mangelboden auch im Feld bestätigt werden (Haneklaus et al., 2007, S. 195). Je höher die N-Zufuhr, umso mehr Nitrat wird akkumuliert und desto stärker werden die sichtbaren S-Mangelsymptome in der Pflanze ausgebildet (Haneklaus et al., 2007, S. 196). Die unter S-Mangel leidenden Pflanzen wiesen insbesondere in der späten Wachstumsphase Chlorosen

(*Gerendás et al.*, 2008a; *Raven et al.*, 2000, S. 793) sowie hellgrüne Adern und intercostale Flächen auf. Die Gelbfärbung war das Ergebnis einer mangelnden Chlorophyllbildung, wie auch die SPAD-Analyse nachweisen konnte (Tab. 4-1, Tab. 9-6). Der Schwellenwert eines S-Mangels liegt im Blatt bei 0,4% pro Gesamt-TM (*Haneklaus et al.*, 2007, S. 189). Pflanzen, welche im Versuch mit 60 mg S/Gefäß gedüngt wurden, überschritten diesen Schwellenwert und unterlagen somit keinem Mangelzustand (Tab. 9-7C). Dies konnte bereits visuell durch dunkelfarbiges und nekrosefreies Blattmaterial bestätigt werden (Tab. 9-5, Abb. 4-1A, Abb. 4-2). Der S-Gehalt vegetativer Anteile von Kulturpflanzen variiert zwischen 0,15 und 0,2% der TM (*Haneklaus et al.*, 2007, S. 184). Diese optimale Konzentration wurde bereits in S1 erreicht (Tab. 9-7C). Die Pflanzen der höchsten S-Stufe scheinen demnach zu viel S zu akkumulieren (0,5–0,7%). Als vegetative Pflanze neigt Pak Choi mit hoher S-Zufuhr zur extremen S-Akkumulation in vegetativem Gewebe in Form von GSH und in den Vakuolen in Form von Sulfat (*Marschner*, 1995, S. 189). Mit steigender S-Zufuhr kommt es hingegen nicht zu einer Akkumulation von Cys, da dieses zytotoxisch ist (*Marschner*, 1995, S. 189). Vielmehr erreicht Cys ein Steady-state-level (ab 1%), jedoch weit über dem im Versuch detektierten S-Gehalt (Tab. 9-7C, Abb. 4-4B). Weshalb dennoch hohe S-Level von großem Vorteil sind, zeigt sich in Kapitel 4.1.4.

In Versuch V1.1. lagen die Gehalte leicht über denen der anderen Versuche, welches am dafür verwendeten Boden „Ostenfeld“ liegt. Eine Bodenanalyse des Substrates (Tab. 9-8) ergab, dass es leicht S-haltig ist, während das in V1.2. und V1.3. verwandte Bodengemisch (Trappenkamp und Quarzsand) S-arm ist (Kapitel 3.1). Die S-Konzentration lag unter starkem S-Mangel dennoch nicht bei null (Tab. 9-7C), denn während eines S-Mangels werden in der Pflanze Schutzmaßnahmen ausgelöst: So führt ein drastischer S-Konzentrationsabfall in der Wurzel zu einer induzierten Expression der Sulfattransportergene (bis zu 100fach) begleitet von einem substantiellen Anstieg der S-Aufnahmekapazität der Transporter (*Hawkesford*, 2000). Zudem wird die Aktivierung von Enzymen stimuliert, welche alternative S-Quellen ermöglichen (*Grubb and Abel*, 2006; *Richter*, 1998). So wird beispielsweise die ATPS-Aktivität unter S-Mangel durch diverse externe (z.B. Licht, N/S-Verhältnis) und interne Faktoren (z.B. S-haltige Komponenten) gesteuert (*Ahmad et al.*, 1999) und katalysiert die Synthese von APS und Pyrophosphat aus Sulfat (*Heldt und Pichulla*, 2008). Zusätzlich sei zu berücksichtigen, dass die Pflanze während der Blattentwicklung ihren Konzentrationszenit erreicht und dieser mit der Blattreifung deutlich absinkt (*Brunold and Suter*, 1984). Wäre die Ernte zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt worden, wären die S-Gehalte entsprechend niedriger ausgefallen.

Sowohl N als auch S werden über das Xylem als auch Phloem transportiert. Demnach manifestieren sich die Mangelsymptome bevorzugt im alten Pflanzenmaterial, da die Nährstoffe bei Bedarf über das Xylem in das jüngere Blattmaterial transportiert werden (Marschner, 1995, S. 85). In Versuch V1.1. konnte dieser altersspezifische Effekt nachgewiesen werden. Im jungen Blatt (JB) waren die S-Gehalte unter niedrigem N-Angebot höher als im alten Blatt (AB), jedoch trat unter hohem N-Angebot der inverse Effekt auf. Im Vergleich zwischen jungen und alten Stiels tritt der gleiche Effekt auf (Tab. 9-11). Folglich ist der S-Gehalt nicht nur altersabhängig, sondern auch abhängig von der N-Düngung.

Da die Makronährstoffe N und S wichtige Funktionen in der Pflanze teilen, wie beispielsweise deren essentielle Beteiligung an der AS- und Protein-Synthese, kann der Ernährungsstatus der Pflanze durch das N/S-Verhältnis widerspiegelt werden. Eine Änderung der N-Düngung beeinflusst die S-Nachfrage und *vice versa*. Besteht ein S-Mangel, so ist der N-Verbrauch reduziert und es akkumulieren entsprechend N-haltige, nicht-proteinogene Komponenten (z.B. Nitrat) (ergo keine Proteine) (Haneklaus et al., 2007, S. 196). Das N/S-Verhältnis erfuhr im vorliegenden Versuch die typische Entwicklung, da es mit hoher N-Zufuhr stieg und mit hoher S-Zufuhr sank (Abb. 4-4C). Das N/S-Verhältnis sank unter niedrigerem N-Level mit steigender S-Düngung von 27,0 auf 9,4 um den Faktor drei bzw. auf 4,5 um wiederum 50% (Tab. 9-7C). Generell besteht jedoch bei der Verwendung und Auswertung eines N/S-Verhältnisses stets die Gefahr falsche Rückschlüsse zu ziehen. So kann ein optimales Verhältnis beider Makronährstoffe vorliegen, jedoch kann dabei die Konzentration der einzelnen Nährstoffe viel zu hoch oder zu niedrig sein. Demzufolge muss stets neben dem N/S-Verhältnis die N- und S-Konzentration berücksichtigt werden. Definitive Rückschlüsse können v.a. bei einer starken Abweichung des Verhältnisses gezogen werden (Marschner, 1995, S. 195).

5.1.3 Einfluss einer variierten Schwefel und Stickstoffdüngung auf die Nitrat- und Sulfat-Konzentration in Pak Choi

Da Nitrat und Sulfat N- und S-Reservoirs bzw. deren Speicherungsformen in der pflanzlichen Vakuole darstellen, können sie durch ein variiertes N- und S-Angebot gesteuert werden (Marschner, 1995, S. 236, 255).

Die Ergebnisse zeigen, dass mit einem Angebot von 1,5 g N die Nitratkonzentration unabhängig von S erhöht wurde (Abb. 4-5A, Tab. 9-7C). Diese Entwicklung wurde zudem

nicht nur in Versuch V1.2. (Tab. 9-7B), sondern auch in einem weiteren Versuch in *Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes* gezeigt (Gerendás et al., 2008a). S-Mangel und Nitratgehalt stehen in einer antagonistischen Beziehung zueinander (Haneklaus et al., 2007, S. 196). Die Nitratakkumulation resultiert aus einer Malfunktion auf enzymatischer Ebene: Die Nitritreduktase besteht aus einem 4Fe-4S-Zentrum und ist folglich unter S-Mangel funktionsunfähig. Es kommt zur Nitrit-Akkumulation, welches über ein Rückkopplungssignal die Reduktion infolge der Nitratreduktase stoppt (Heldt and Piechulla, 2008, S. 267). Die Resonanz ist eine Nitratakkumulation in der Vakuole sowie die vermehrte Synthese nicht-proteinogener AS und N-haltiger Metabolite (Bones et al., 1994; Schnug, 1990). Je höher die N-Zufuhr ist, desto mehr wird akkumuliert und desto stärker werden die sichtbaren S-Mangelsymptome in der Pflanze ausgebildet (Haneklaus et al., 2007, S. 196), wie sich auch im Versuch herausstellte (Abb. 4-1). Eine N-Düngung muss im Vergleich zu S nicht allzu hoch sein, um den Nitratgehalt zu erhöhen (Haneklaus et al., 2007, S. 196).

Anders als in N1, trat ein S-Effekt in S2N2 auf. Dort sank die Nitratkonzentration (Abb. 4-5A), da mit der S-Düngung S für die Nitratreduktase geliefert wurde (Heldt and Piechulla, 2008, S. 267). Um eine Nitratakkumulation zu verhindern, ist eine moderate S-Zufuhr unabdingbar (Marschner, 1995, S. 196). Viele weitere externe Faktoren sind zudem relevant, wie z.B. der Erntezeitpunkt. Die Ernte erfolgte in den frühen Morgenstunden, zu welchem hohe Nitratgehalte im Blatt herrschen. Nachts erfolgt die Nitrataufnahme und -speicherung (Heldt and Piechulla, 2008, S.267). Tagsüber überträgt die Photosynthese die für die Enzyme (Nitrat- und Nitritreduktase) notwendige Energie in Form von Elektronen. Nitrat wird letztendlich ins Cytoplasma freigesetzt und in die Assimilation eingeschleust (Heldt and Piechulla, 2008, S. 267), weshalb die Gehalte ab den Morgenstunden sinken. Auch das Pflanzenalter beeinflusst die Nitratgehalte. So erreicht die Nitratreduktase bei 27% der finalen Blattentwicklung ihren Aktivitätszenit. Danach sinkt die Aktivität der Nitratreduktase mit fortschreitendem Blattwachstum und Nitrat akkumuliert in der Vakuole (Wakhloo and Staudt, 1988). In Versuch V1.3. wurde der altersspezifische Effekt auf die Nitratgehalte infolge einer IC-Analyse deutlich: Im alten Blatt wurden mit maximal 72,85 mg/g TM deutlich höhere Gehalte erreicht als im jungen (<33,59 mg/g TM). Durchweg wurden diese Maximalgehalte nicht anhand der höchsten S-Düngung, sondern eher unter moderaten oder sogar S-Mangelbedingungen erzielt (Tab. 9-9). Ergo: Je älter das Blatt, umso höher die Nitratkonzentration. Auch variieren die Nitratgehalte jahreszeitenabhängig: im Winter liegen diese generell höher als im Sommer (4.000 bzw. 700–1.400 mg/kg FM)

(*Kallabis-Rippel*, 2000, S. 192). Versuch V1.1 wurde im Winter, die beiden anderen im Frühjahr angesetzt (Tab. 9-2). Zudem spielt die Pflanzenfraktion eine zentrale Rolle: Laut *Kallabis-Rippel* (2000, S. 116) sind die Gehalte im Stiel (2275 mg/kg FM) durchweg höher als im Blatt (2787 mg/kg FM) – unabhängig von Erntedatum, Standweite oder Sorte. Aufgrund unzureichendem Pflanzenmaterials konnte in Versuch V1.1. die Nitrat- und Sulfat-Messung nicht durchgeführt und der fraktionsspezifische Effekt nicht offengelegt werden (Tab. 9-11). Der oben beschriebene Effekt wäre allenfalls zu erwarten gewesen. Pak Choi enthält durchschnittlich 2146–2490 mg Nitrat/kg FM (*Kallabis-Rippel*, 2000, S. 205). Im Experiment wurden vergleichbare Konzentrationen erfasst (umgerechnet 1.000–5.000 mg/kg FM) (Tab. 9-7C). Mit N₂ wurde die empfohlene tägliche Nitratzufuhr deutlich überschritten (*Preussmann*, 1993, S. 9). Pak Choi sollte nicht mehr als 2500 (Frühjahr) und 4500 mg/kg FM (Winter) enthalten (*Kallabis-Rippel*, 2000, S. 200), da sonst die Gefahr einer Nitrosaminbildung besteht, welche krebserregende Wirkungen mit sich ziehen (*Preussmann*, 1993, S. 9). Durch Gemüse werden bereits 70% des täglich zugeführten Nitrats abgedeckt (*Reinken*, 1992; *Selenka and Brand-Grimm*, 1976). Davon stammen 40–50% aus Blattgemüse (z.B. Pak Choi), das in voller vegetativer Entwicklung extrem nitratreich ist (*Venter*, 1984). Infolgedessen ist eine Düngung von 0,75 g N/Gefäß für Pak Choi ausreichend, um Gesundheitsrisiken abwenden zu können.

Die Sulfatkonzentration konnte deutlich infolge der ansteigenden S-Düngung erhöht werden (Abb. 4-5B). Vor allem die höchste S-Düngung erzielte Höchstgehalte von 3,95 mg/g TM (Tab. 9-7C). Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unterstützen den Effekt, dass mit steigender S- (50 und 200 mg S/Gefäß) und niedriger N Düngung (1 g N/Gefäß) die Sulfatkonzentration steigt (*Gerendás et al.*, 2008a). Im vorliegenden Versuch spielte die N-Düngung eine eher untergeordnete Rolle, da in allen drei Experimenten (V1.1.-V1.3.) keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren (Abb. 4-5B). Erhöhte N- und Nitratkonzentrationen führen normalerweise zur Aktivierung des Enzyms APS, welches die Sulfatesterbildung sowie die Sulfatreduktion und somit letztendlich die S-Assimilation in der Pflanze ermöglicht und die Sulfatkonzentration herabsetzt (*Marschner*, 1995, S. 257). Da die Konzentration jedoch nicht beeinflusst wurde, ist die Schlussfolgerung, dass selbst 1,5 g N/Gefäß dafür nicht ausreichend war. Zudem wurde im Rahmen einer Studie nachgewiesen, dass unter N-Mangel (0,2 und 0,04 mM) zwar die Aktivität der Nitratreduktase um 30% herabgesetzt ist, aber die ATP-Sulfurylase immer noch zu 80% aktiv ist (*Brunold and Suter*, 1984). Demnach hatte die N-Gabe keinen Effekt auf den S-

und Sulfatgehalt. Wie auch im Versuch bestätigt, konnte ausreichend S assimiliert werden (Abb. 4-4B) (*Brunold and Suter, 1984*). Das Alter der Pflanze spielt eine weitere zentrale Rolle, denn mit hoher N-Düngung (4 g/Gefäß) steigt der Sulfatgehalt insbesondere in den älteren Blättern, während er in jüngeren Blättern teilweise sinkt (*Gerendás et al., 2008a*). Dieser Effekt konnte nach Altersaufteilung des Pflanzenmaterial anhand der IC-Analyse verdeutlicht werden. Jedoch nur unter S-Mangel und der höheren N-Düngung von 1,5 g/Gefäß. Mit einer höheren S-Gabe von 60 bzw. 300 mg waren die Sulfatgehalte im alten Blattmaterial hingegen leicht niedriger als in seinem jungen Vertreter (Tab. 9-9).

5.1.4 Auswirkung der variierten Schwefel und Stickstoff-Düngung auf in Pak Choi detektierte Glucosinolate

GLS bestehen aus mindestens zwei S-Atomen in Form der Sulfatgruppe und der β -thioglycosidischen Bindung zur Glucose sowie aus einem N-Atom (*Holst and Williamson, 2004*). Alkylthioalkyle beinhalten zudem das S-haltige Meth, welches Bestandteil der modifizierten GLS-Seitenkette ist (*Halkier and Gershenzon, 2006*). Demnach liegt die Schlussfolgerung nicht fern, durch eine kontrollierte N- und S-Zufuhr die Konzentration und das Muster dieser Metabolite bewusst steuern zu können (*Bloem et al., 2001*).

Die Versuchsergebnisse bekräftigen diese Aussage. Während in der S-Mangelstufe sehr geringe Konzentrationen detektiert wurden, stiegen diese deutlich mit gesteigerter S-Düngung an (Abb. 4-6A, Tab. 9-7C). Zudem verlief dieser Anstieg gestaffelt in den jeweiligen drei S-Düngungsstufen 0, 60 und 300 mg (Abb. 4-6A). Auch die Arbeitsgruppe von *Chen et al. (2006)* konnte in Pak Choi nachweisen, dass unter niedriger S-Düngung der GLS-Gehalt reduziert war und mit steigender S-Zufuhr von 256 mg/Gefäß anstieg. Zum einen wird vermutet, dass eine niedrige GLS-Konzentration unter S-Mangel mit einer Remobilisation des in den GLS gebundenen S begründet werden kann (*Schnug and Haneklaus, 1993*). Mit Hilfe der Myrosinase wurde S enzymatisch freigesetzt und der S-Assimilation zur Verfügung gestellt (*Schnug and Haneklaus, 1993*). Folglich würde der GLS-HP-Gehalt ansteigen. Zum anderen widerlegten Ergebnisse an *Lepidium sativum* L. (Kresse) (*Gerendás et al., 2008b*) diese Vermutung, da der Anteil der Hydrolyseprodukte letztendlich nur bei 10% lag. Jedoch können ebenfalls die Hydrolyseprodukte katabolischen Prozessen in der Pflanze unterliegen (weiteres siehe Kapitel 5.1.6). Dem Versuch zufolge hat S einen deutlichen Effekt auf die GLS-Konzentration, während kein N-Effekt nachgewiesen wurde (Abb. 4-6A). Dies wird durch die Versuche V1.1. und V1.2. bestätigt (Tab. 9-7B, C). Während einige Arbeitsgruppen den GLS-Gehalt mit N erhöhen konnten

(*Omirou et al.*, 2009; *Zhao et al.*, 1994), konnte er andererseits mit N reduziert werden (*Li et al.*, 2007). Teilweise verblieb der Gehalt jedoch unberührt (*Bloem et al.*, 2007; *Schnug*, 1990). Auch im Feldversuch wurde dieser Effekt deutlich: Nach *Rosen et al.* (2005) konnte der GLS-Gehalt in Kohl durch eine niedrigere N- (125 kg/ha) und eine hohe S-Versorgung (110 kg/ha) maximiert werden. Den gleichen Effekt dokumentierte die Arbeitsgruppe von *Haneklaus et al.* (2007, S. 196), weshalb letztendlich schlussgefolgert werden kann, dass es generell keine N-abhängige Steigerung des GLS-Gehaltes gibt. Da die wissenschaftliche Erkenntnis zum N-Effekt auf die GLS-Konzentration nach wie vor widersprüchlich ist, muss das Muster der individuellen GLS berücksichtigt werden. Wie sich noch im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellen wird, unterliegen aliphatische oder aromatische GLS anderen düngungsspezifischen Effekten als die indolischen Vertreter (siehe Kapitel 5.1.5).

In Kohlrabi und Broccoli wurde die Konzentration der GLS insbesondere durch einen interaktiven N:S-Effekt beeinflusst (*Gerendás et al.*, 2008a; *Li et al.*, 2007). Dieser interaktive Effekt könnte jedoch sorten- oder düngungsabhängig sein, denn für die Pak Choi-Sorte *Joi Choi* wurde im Versuch kein interaktiver N:S-Effekt (0,1507) auf die GLS-Konzentration deutlich (Tab. 9-12).

In der vorliegenden Arbeit wurden Höchstgehalte von 7,247 $\mu\text{mol/g}$ TM erfasst (Tab. 9-7C). Unter düngungsunabhängigen Bedingungen liegt die GLS-Konzentration in Pak Choi bei 35,67 $\mu\text{mol GLS/g}$ TM (*Wiesner et al.*, 2013). Jedoch erntete diese Arbeitsgruppe die Pflanzen bereits nach 12 Tagen – kurz nach der Keimung. Ein Zeitpunkt, zu welchem generell höhere GLS-Konzentrationen akkumuliert werden (*Barker and Bryson*, 2007, S. 29). Der Höchstgehalt wurde infolge der höchsten S- (300 mg/Gefäß) und der niedrigeren N-Düngung (0,75 g/Gefäß) erreicht (Abb. 4-6A). In einem vorausgegangenen Versuch unserer Arbeitsgruppe wurde ein vergleichbarer Effekt mit 1,0 g N/Gefäß und 200 mg S/Gefäß gezeigt (*Gerendás et al.*, 2008b). Auch ein weiterer Gefäßversuch an Pak Choi (*Chen et al.*, 2006) erzielte mit der niedrigsten N- (0,28 g/Gefäß) und höchsten S-Düngung (256 mg/Gefäß) Höchstgehalte. Unter Feldbedingungen konnte die Arbeitsgruppe von *Ahmad et al.* (2007) die Maximalkonzentration in *Brassica napus* L. durch eine gleichzeitig hohe N- (80 kg/ha) und S-Düngung (30 kg/ha) erzielen.

Aufgrund einer gesteigerten FM besteht das Risiko eines Verdünnungseffektes der Nährstoffe (*Gerendás et al.*, 2008a). Hierfür wurde das Vektor-Diagramm nach *Koricheva* (1999) in die Datenauswertung mit einbezogen, um düngungsspezifische Effekte auf die Konzentration von Inhaltsstoffen graphisch visualisieren und interpretieren zu können. Nach Umrechnung der Inhaltsstoffkonzentration in $\mu\text{mol/g}$ FM (Tab. 9-13) konnte verdeutlicht

werden, ob die GLS und GLS-HP einer Synthesesteigerung, -senkung, Verdünnung oder Aufkonzentrierung unterlagen. Während mit konstanter N- und steigender S-Düngung steigende GLS-Konzentration und folglich kein Verdünnungseffekt aufgedeckt werden konnte (Gerendás *et al.*, 2009) (Abb. 9-7B), war der Effekt einer N-Düngung noch widersprüchlich. Unter solchen Bedingungen wurde im Rahmen einer vorherigen Arbeit unserer Forschungsgruppe ein Verdünnungseffekt der Inhaltsstoffe vermutet (Gerendás *et al.*, 2009). Im Versuch konnte mit variiertem S-Düngung die Synthese der GLS herabgesetzt werden, sobald mehr N gedüngt wurde. Hingegen konnte ein deutlicher Verdünnungseffekt mit der höchsten S- und N-Düngung aufgedeckt werden (Abb. 9-7A). Somit kann die Vermutung unserer Arbeitsgruppe diesbezüglich bestätigt werden.

Als weiterer Einflussfaktor der GLS sollte das Pflanzenstadium zum Zeitpunkt der Ernte berücksichtigt werden. Im Wachstumsverlauf sind die GLS an komplexe Biosynthese- und *in vivo* Abbau-Mechanismen gekoppelt (McGregor, 1988). So erreichen GLS ihren Höchstgehalt kurz vor der Blütezeit (70 $\mu\text{mol/g TM}$) und sinken bis zur Samenreife stetig ab (56 $\mu\text{mol/g TM}$), da diese im Samen akkumulieren (Bloem *et al.*, 2001). Die Ursache ist eine steigende Myrosinaseaktivität im Wachstumsverlauf (Rask *et al.*, 2000). Die im Versuch niedrige GLS-Konzentration könnte demnach eine einfache Resonanz des Pflanzenalters sein. Da offenbar GLS innerhalb der Pflanze mobil sind (Lykkesfeldt and Moller, 1993; Nour-Eldin *et al.*, 2012), besteht theoretisch die Möglichkeit, dass diese zu den Myrosinzellen transportiert und dort hydrolysiert wurden (Petersen *et al.*, 2002). Der im intakten Pflanzenmaterial ablaufende hydrolytische Mechanismus würde die im Versuch relativ niedrige GLS-Konzentration erklären (Abb. 4-6A). In einem großen Sortenvergleich von *Brassica rapa*-Arten wurden Konzentrationen detektiert (4,48–31,58 $\mu\text{mol/g TM}$), welche mit denen des Versuches zu vergleichen sind (Kim *et al.*, 2010). Zudem besteht die Möglichkeit, dass indolische GLS infolge von AsA, welche gemeinsam mit GLS in S-Zellen lagert, zu Ascorbigen und diverse Oligomere synthetisiert wurden (Agerbirk *et al.*, 2009; Bones and Rossiter, 2006). Die IC-Analyse ermöglichte die Bestimmung der AsA-Konzentration und zeigte, dass unter S-Mangel die Konzentration gering, mit S1 anstieg und mit der höchsten S-Gabe wieder absank (Tab. 9-9). Da AsA eine Stimulation der Myrosinaseaktivität ermöglicht, werden vermehrt Hydrolyseprodukte synthetisiert (Burmeister *et al.*, 2000). Jedoch muss berücksichtigt werden, welche Form des AsA vorliegt, da laut Ohtsuru und Hata (1979) nur L-AsA myrosinaseaktivierend wirkt. Zudem führt die Anwesenheit von AsA zu einer erhöhten Synthese indolischer GLS zu Ascorbigen (Agerbirk *et al.*, 2009; Bones and Rossiter, 2006) und der GLS-HP-Gehalt sinkt wieder.

Eine weitere Erklärung für den geringen GLS-Gehalt liefert das Bodenmaterial. In Versuch V1.2. und V1.3. wurden die Pflanzen in einer leichten Bodensubstanz in Form groben Quarzsandes angezogen. Diese Bodenform führt nachweislich zu einer Reduktion des Gesamtgehaltes von bis zu 40% (*Ciska et al.*, 2000). Überdies kann in Betracht gezogen werden, dass chemische Vorgänge zur GLS-Degradation führten. Bereits die Anwesenheit von KOH(aq), BaCl₂, Ba(OH)₂ oder AgNO₃ provozieren eine GLS-Reduktion (*Gadamer*, 1897a, 1897b). Auch Säuren oder Basen sind Ursachen eines GLS-Abbaus (*Fenwick et al.*, 1981). Eine dreistündige Erhitzung bei 100°C dezimiert den GLS-Gehalt um 100% (*Bones and Rossiter*, 2006) durch metabolischen Abbau in H₂S, CO₂ und diverse N-haltige und nicht-GLS-Bestandteile (*Lanzani et al.*, 1976). Folglich beeinflusst eine Vielzahl nichtenzymatischer Faktoren die GLS-Konzentration.

Es liegt die Vermutung nahe, dass GLS in *Brassicaceae*n verlagert werden (*Du and Halkier*, 1998). Jedoch sind die Details des Transports, der Transportform und der möglichen Beteiligung von spezifischen Transportern, bislang größtenteils unbekannt. Erste Hinweise zum Weg und der Transportform der GLS liefert eine physikochemisches Prinzip, das eine Verlagerung intakter GLS über das Phloem theoretisch ermöglicht (*Brudenell et al.*, 1999). Der Vorteil ist das Umgehen der unerwünschten Hydrolyse durch die Myrosinase, welche insbesondere um die Leitbündel lokalisiert ist. Es wird vermutet, dass Desulfo-GLS für deren Verlagerung in die Myrosin-Zellen transportiert und dort zu GLS sulfatisiert werden (*Chen et al.*, 2001). Für die Verlagerung innerhalb des Blattes, sowie den Import in die S-Zellen ist der Transporter GTR1 zuständig (*Nour-Eldin et al.*, 2012). Einen weiteren Nachweis lieferten *Chen et al.* (2001), die im Blattmaterial radioaktiv markierte GLS später im Samen detektieren konnten. *Petersen et al.* vermuten, dass in Myrosinzellen transportierte GLS dort hydrolysiert werden (*Petersen et al.*, 2002). Demnach könnten GLS teilweise bereits im intakten Pflanzenmaterial abgebaut und ihre Konzentration herabgesetzt werden.

5.1.5 Auswirkung der Schwefel- und Stickstoff-Düngung auf aliphatische, aromatische und indolische Glucosinolate

Auf den ersten Blick sind, wie bereits erwähnt, die Forschungsergebnisse einer variierten N- und S-Düngung auf GLS widersprüchlich. Es wird sich im weiteren Verlauf herauskristalisieren, dass an dieser Stelle eine Betrachtung der in aliphatisch, aromatisch und indolisch klassifizierten GLS durchaus sinnvoll ist. Denn diese Differenzierung ermöglicht düngungsspezifische Variationen aufdecken und interpretieren zu können.

Nach *Chen* und seiner Arbeitsgruppe (2006) reagieren insbesondere aliphatische GLS sensitiver auf eine N- und S-Düngung als indolische oder aromatische GLS. Ein Erklärungsansatz bietet die chemische Grundstruktur: aliphatische GLS werden in Olefine und Alkylthioalkyle klassifiziert (Abb. 9-1), von denen letztere aufgrund der S-haltigen Seitenkette drei S-Atome aufweisen, während Olefine zwei S-Atome aufweisen (*Zhao et al.*, 1994; *Li et al.*, 2005). Im vorliegenden Versuch wurde die S-Konzentration nicht deutlich durch N beeinflusst, sodass die aliphatischen GLS auch nur leicht durch die Düngung variiert wurden (Abb. 4-6B). Zudem begünstigt ein niedriges N- und ein hohes S-Angebot die Synthese aliphatischer GLS (*Chen et al.*, 2006). Denn in einem Schritt der GLS-Synthese wird aus aci-Nitro-Verbindungen nur dann S-Alkyl-Thiohydroximat synthetisiert, wenn die daran beteiligte GST und Cys als S-Donor in ausreichenden Mengen vorliegen. Unter S-Mangel sind diese reduziert (*Halkier and Gershenzon*, 2006). Eine hohe N-Zufuhr von 1 g/Gefäß setzt hingegen die Konzentration aliphatischer GLS herab (*Omirou et al.*, 2012). Dieser Effekt wurde nur unter S-Mangel deutlich (Abb. 4-6B).

An dieser Stelle ist die Betrachtung der individuellen aliphatischen GLS empfehlenswert, um die düngungsspezifischen Effekte besser nachvollziehen zu können. In die Seitenkette aliphatischer GLS können Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Valin eingebaut werden (*Halkier and Gershenzon*, 2006). Im Versuch basierten alle aliphatischen GLS allesamt auf der S-haltigen AS Meth (Abb. 9-1). So zog sich der S-Effekt deutlich in allen GLS durch (Tab. 9-12), wie mehrfach bestätigt (*Chen et al.*, 2006; *Gerendás et al.*, 2009; *Kim et al.*, 2002; *Mithen et al.*, 1995). Interessanterweise wurde die Konzentration der aliphatischen GLS PRO, GRA, GNP durch N deutlich reduziert, während GI und GRE von der N-Düngung unberührt blieben. GBC blieb von N als auch S unbeeinflusst. Von einer interaktiven N:S-Düngung waren PRO, GRA und GRE beeinflusst. Nach Einteilung der aliphatischen GLS in Alkenyle (PRO, GNP, GBC) und S-haltige Alkylthioalkyle (GI, GRA, GRE) kann gefolgert werden, dass der interaktive Düngungsfaktor keine maßgebliche Rolle spielt. Letztendlich unterliegt der Syntheseweg aliphatischer GLS einer Vielzahl unterschiedlichster Faktoren und bedarf einer gezielten Betrachtung auf je ein GLS.

Aromatische GLS basieren, anders als aliphatische GLS, auf der aromatischen AS Phenylalanin oder dem daraus generierten Tyrosin (*Horn et al.*, 2005, S. 184; *Mithen et al.*, 2000). In Pak Choi wurde nur GNI als einziges aromatisches GLS detektiert (Abb. 4-6C) (*Chen et al.*, 2006). Dies führt zur Schlussfolgerung, dass entweder keine weiteren aromatischen GLS in Pak Choi vertreten sind oder in nicht mehr detektierbaren und folglich zu vernachlässigen Mengen. In Versuch V1.3. wurde GNI deutlich durch die gestaffelte S-

Düngung erhöht (Abb. 4-6C). Jede S-Stufe führte zu einer signifikanten Steigerung – und das sowohl unter niedrigem (0,75 g) als auch hohem (1,5 g) N-Niveau (Abb. 4-6C). *Vallejo et al.* (2003) wiesen ebenso nach, dass im Vergleich zu einer S-Mangeldüngung eine hohe S-Düngung (150 kg/ha) die Konzentration aromatischer GLS deutlich steigerte. Interessanterweise führte ein moderates S- und höheres N-Niveau zu einer herabgesetzten GNI-Konzentration (Abb. 4-7H), wie auch die Arbeitsgruppe von *Kim et al.* (2002) durch eine 30 mM N-Düngung in *Brassica rapa* L. (Rübsamen) oder auch die Arbeitsgruppe von *Vallejo et al.* (2003) bestätigen konnten. Hingegen konnten *Zhao et al.* (1994) in Rapssamen keine signifikanten Unterschiede aromatischer GLS durch eine variierte N- (0,100, 200, 300 kg/ha) und S-Düngung (0, 50, 100 kg/ha) dokumentieren. Demzufolge scheint der Effekt sortenabhängig zu sein (*Zhao et al.*, 1994). Generell kann das Fazit gezogen werden, dass der düngungsabhängige Effekt aromatischer GLS genau wie bei den aliphatischen GLS verlief. Dabei werden aufgrund der hohen statistischen Signifikanz aromatische GLS bevorzugt durch eine gleichzeitige N- und S-Düngung synthetisiert (Tab. 9-12).

In die Synthese indolischer GLS ist die AS Tryptophan involviert (*Mithen et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass indolische GLS wie auch aromatische und aliphatische GLS durch hohe S-Düngungslevel gesteigert werden (Abb. 4-6D). Jedoch liegt die Konzentration um den Faktor zehn niedrigerer als die der aliphatischen GLS. So wurden beispielsweise in S1N1 0,22 indolische und 2,03 $\mu\text{mol/g}$ TM aliphatische GLS detektiert (Tab. 9-7C). *Hu et al.* (2011) erreichten durch eine mit S1 vergleichbaren Düngung (32 mg/Gefäß) ähnliche Konzentrationen indolischer GLS (0,45 $\mu\text{mol/g}$ TM). Auch die Forschungsgruppe von *Li et al.* (2007) erzielte durch vergleichbare Düngungsbedingungen (84 und 490 mg S/Gefäß, 0,64 g N/Gefäß) übereinstimmende Konzentrationen indolischer GLS. In der vorliegenden Arbeit wurde infolge der N2-Düngung zudem die Konzentration von 0,399 auf 0,601 $\mu\text{mol/g}$ TM verdoppelt (Tab. 9-7C). Im Gegensatz zum N-Effekt in der vorliegenden Arbeit (Tab. 9-12), wurde laut *Li et al.* (2007) durch 1,28 g N/Gefäß der indolische GLS-Gehalt nicht signifikant beeinflusst. Dennoch kann eine Überzahl an Studien die in der Arbeit, durch eine höhere N-Düngung, gesteigerte Konzentration bestätigen (*Kim et al.*, 2002; *Shattuck and Wang*, 1994). Entsprechend konnte auch gezeigt werden, dass sobald wenig N und S gedüngt wurde, die Konzentration indolischer GLS sinkt (*Omirou et al.*, 2009), da hier die für die GLS-Synthese notwendigen N- und S-Bausteine fehlten. Dieser Effekt konnte in der Arbeit zwar nicht signifikant nachgewiesen werden, jedoch geht die Tendenz in Richtung einer Senkung (Tab. 9-12). Letztendlich ist die Konzentration indolischer GLS nicht durch eine alleinige S- oder auch N-Düngung regulierbar. Vielmehr spielt dort der

interaktive Düngungseffekt eine nennenswertere Rolle (*Omirou et al.*, 2012), wie auch deutlich im Versuch belegt wurde (Abb. 4-6D).

Pak Choi enthält die vier indolischen GLS (GB, 4OH, 4M, NGB) wie auch *Chen et al.* (2006) bestätigten (Abb. 4-7G, E, J, K). Zwar konnten sie 4OH nicht detektieren, jedoch ist in Pak Choi die 4OH-Konzentration generell sehr niedrig (Abb. 4-7C). Alle indolischen GLS wurden im Pflanzenmaterial durch S vermehrt synthetisiert (Abb. 4-6D) (*Chen et al.*, 2006; *Hu et al.*, 2011). Teilweise konnte die Konzentration erhöht werden, sobald mehr N gedüngt wurde (Abb. 4-7 F, G). Dieser N-Effekt trat sowohl unter der S-Mangelbedingungen (bei 4OH) als auch mit 300 mg S/Gefäß (bei GB) auf. Das am meisten synthetisierte indolische GLS war GB (0,004-0,289 $\mu\text{mol/g TM}$), auf das es einen deutlichen interaktiven S:N-Effekt gab (Abb. 4-7G). Hingegen sind NGB, 4OH und 4M nur durch S gesteigert worden, während es keinen deutlichen N-Effekt gab. Dennoch reicht die Tendenz in Richtung einer Steigerung der GLS mit N (Abb. 4-7E, J, K). Dass beispielsweise 4M tatsächlich infolge einer erhöhten N-Düngung vermehrt synthetisiert wird, konnte die Arbeit von *Omirou et al.* (2009) bestätigen. Demnach unterliegen indolische GLS einem interaktiven N:S-Effekt unter S₂N₂ (*Agerbirk et al.*, 2009) (Abb. 4-6D).

Abschließend sei hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit die aromatischen und aliphatischen GLS durch eine hohe S- (300 mg) aber niedrige N-Düngung (0,75 g) erhöht wurden, während hingegen die indolischen GLS infolge von 300 mg S/Gefäß und 1,5 g N/Gefäß Höchstgehalte erzielten. Da die aliphatischen GLS durchschnittlich mehr als 80% der GLS-Gesamtkonzentration repräsentieren, resultiert der für die aliphatischen GLS aufgetretene Düngungseffekt überwiegend für die Gesamtkonzentration der GLS. Dort wurden vermehrt GLS unter hohem S- und moderatem N-Level erfasst. Bei Betrachtung der in aliphatisch, aromatisch und indolisch klassifizierten GLS sowie der einzelnen individuellen GLS wird deutlich, dass eine N- und S-Düngung unterschiedliche Auswirkungen haben. Die Ergebnisse erbringen den Beweis, dass eine reine Betrachtung der Gesamtkonzentration nicht aussagekräftig ist. Die durch eine Düngung gesteuerte Synthese individueller GLS sollte stets Bestandteil der Auswertung sein, um düngungsspezifische Effekt besser nachvollziehen zu können.

5.1.6 Effekte einer variierten Schwefel- und Stickstoff-Düngung auf Konzentration und Muster der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte

Da die GLS-HP aus der GLS-Hydrolyse resultieren, sind diese indirekt durch die applizierte N- und S-Düngung zu regulieren (*Schnug and Haneklaus, 1993; Schnug et al., 1995*). Nach der Sulfatabspaltung beinhalten die GLS-HP nur noch maximal zwei mögliche S-Quellen: zum einen das in der Seitenkette (R) vorliegende Meth-Derivat, und zum anderen die Thiolgruppe (R-SH), welche aus Cys synthetisiert wurde (*Bones and Rossiter, 2006*). Letzteres trifft jedoch nur auf ITC und Epithionitrile zu. Zudem stammt die Meth-haltige Seitenkette nur aus der GLS-HP-Vorstufe Alkylthioalkyl. In S-Mangelpflanzen konnten erst keine GLS-HP detektiert werden (Tab. 9-10C), da unter S-Mangelbedingungen weniger S-haltige (z.B. Cystein, Methionin) aber S-freie (z.B. Arginin, Aspartat) AS synthetisiert werden und demnach weniger für die Synthese S-haltiger GLS-HP zur Verfügung stehen (*Wrigley et al., 1980*). Laut dieser Studie sanken unter S-Mangel (0,1%) im Vergleich zur S-reichen Düngung (0,25%) die Meth- bzw. Cys-Konzentration (von 11 auf 5 bzw. von 21 auf 7 nmol/16 g Protein-N), während Arginin und Aspartat stiegen (27 auf 34 bzw. 33 auf 93 nmol/16 g Protein-N). Zudem ist unter S-Mangel die GLS-HP-Konzentration nicht nur aufgrund unzureichender S-Quellen reduziert. Eine geplante N- und S-Düngung kann zudem die Aktivität der Myrosinase steuern: Es konnte deutlich werden, dass insbesondere unter S-Mangel die Myrosinaseaktivität erhöht ist (*Gerendás et al., 2009*). Die Vermutung war zunächst die Realisierung einer S-Remobilisation aus Metaboliten (*Schnug, 1990*). Jedoch ist unter diesen Mangelbedingungen das Spektrum der Myrosinase-Isoformen herabgesetzt, da Sulfat für die Induktion der Genexpression diverser Thioglucosidasen notwendig ist (*Bones et al., 1994*). *Brassica* besitzen eine Vielzahl Myrosinaseisoformen mit verschiedenen Funktionen, deren Genexpression durch diverse externe und interne Faktoren unterschiedlich reguliert wird (*Bones et al., 1994*). Da zudem die Myrosinase durch AsA aktiviert wird (*Ohtsuru and Hata, 1979*), aber mit steigender N-Düngung der AsA-Anteil insbesondere im jungen Blattmaterial niedriger war (Tab. 9-9), war das Enzym weniger aktiv und der Anteil der GLS-HP vermutlich geringer als erwartet (Tab. 9-10). Bei Betrachtung der Gesamtpflanze in Versuch V1.2. wurde hingegen die AsA-Konzentration nicht düngungsabhängig variiert (Tab. 9-9).

Es stellt sich nun die Frage, ob eine weitere Erhöhung über 300 mg S die düngungsspezifischen Effekte auf die GLS-HP verstärkt hätte. Diese Überlegung kann jedoch sofort verworfen werden, da im Rahmen einer vorhergegangenen Arbeit eine doppelt so hohe S-Düngung von 600 mg S/Gefäß keine signifikante Steigerung der GLS-HP nach

sich zog (Abb. 9-5). Sobald unter N1 die S-Düngung auf 60 mg erhöht wurde, stiegen die Konzentrationen signifikant an, und verdoppelten sich in der höchsten S-Stufe (Tab. 9-10). Unter dem höherem N-Niveau konnte die Konzentration der GLS-HP von S1 zu S2 sogar verdreifacht werden. Der Höchstgehalt von 1,219 $\mu\text{mol/g}$ FM wurden dennoch mit der niedrigeren N- und höchsten S-Düngung erzielt (S2N1) (Tab. 9-10). Die Konzentration der GLS-HP war durchweg N-düngungsunabhängig (Tab. 9-12, A). Zudem ist wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert das Pflanzenalter relevant, da mit steigendem Wachstumsalter die Myrosinaseaktivität steigt und sich folglich komplexe Abbaumechanismen wie in diesem Beispiel die GLS-Hydrolyse häufen (McGregor, 1988).

Jedoch darf aufgrund einer alleinigen Analyse und Interpretation der GLS-HP-Gesamtkonzentration keine definitive Schlussfolgerung gezogen werden. Hier ist es ebenfalls ratsam die individuellen Hydrolyseprodukte unabhängig voneinander bzw. die in ITC, Nitrile und Epithionitrile klassifizierten GLS-HP zu analysieren:

Die ITC werden positiv durch eine hohe S- (20 mg/Gefäß) und eine niedrige N-Zufuhr (1 g/Gefäß) beeinflusst (Gerendás *et al.*, 2008a). Diese Aussage kann zweifellos bestätigt werden, denn mit 300 mg S und 0,75 g N wurde der Höchstgehalt erreicht (Tab. 9-10). Sobald aber die N-Düngung erhöht wurde, fand keine Aufkonzentrierung der ITC mehr statt. Zudem konnte anders als bei Gerendás *et al.* (2009) kein interaktiver S:N-Effekt erfasst werden. Die Erklärung ist, dass Gerendás *et al.* Pflanzenmaterial mit nur einem GLS-HP (Sinigrin) analysierten, sodass keine düngungsspezifischen Rückschlüsse auf ein breites Muster vereinzelter Formen zu schließen ist, welches letztendlich den besonderen Wert dieser Arbeit widerspiegelt. In einem weiteren Versuch von Gerendás *et al.* (2008a a) konnte in Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) ein interaktiver S:N-Effekt detektiert werden. Bei der Aufteilung in die drei ITC 2PE-, 3-But- und 4Pent-ITC wird deutlich weshalb sich in der Arbeit kein interaktiver S:N sowie kein N-Effekt ergab: Zwar wurde 4-Pent-ITC mit deutlichem N-Effekt reduziert, da jedoch beide anderen ITC keinen N-Effekt aufwiesen, hob sich dieser N-Effekt bei Betrachtung der Gesamt-ITC wieder auf (Abb. 4-10A, Abb. 4-8B). Somit überwiegt der düngungsspezifische Effekt der zwei ITC 3-But- und 4Pent-ITC (Abb. 4-10A, C). Zusätzlich sind beide in der Sorte *Joi Choi* die ITC-Hauptvertreter (Kallabis-Rippel, 2000, S. 208). In allen drei Versuchen waren die ITC-Höchstgehalte im Vergleich zu den Nitrilen oder Epithionitrilen niedriger (Abb. 4-8A, B, C). Eine mögliche Erklärung wäre ein unausgewogenes Gleichgewicht aus Myrosinase und ESP, sowohl in Konzentration oder Aktivität (Holst and Williamson, 2004; Vos *et al.*,

2008). Weiteres ist dazu im unteren Kapitelabschnitt der Epithionitrile erläutert. Zudem kann Schwefelwasserstoff (H_2S), welches aus der Luft über die Blattstomata aufgenommen wird, die ITC-Synthese unterdrücken (*Bones and Rossiter, 2006*). Es gibt den Effekt, dass unter Normalbedingungen flüchtige ITC vermutlich infolge des Zelltodes freigelassen werden (*Cole, 1980*) und somit sowohl die GLS-HP- als auch ITC-Konzentration herabgesetzt werden. Es konnte beschrieben werden, dass bereits im intakten Pflanzenmaterial GLS hydrolysiert werden können (*Thornalley, 2002*). Die nun vorliegenden ITC werden unter deutlichem S-Mangel über den Mercaptursäurestoffwechsel wieder abgebaut und S für die Pflanze remobilisiert (*Thornalley, 2002*). Die ITC-Konzentration wurde infolge dessen reduziert.

Die Nitril-Konzentration wurde nachweislich durch S aufkonzentriert (Abb. 4-8C). Jedoch war, anders als beispielsweise in der Arbeitsgruppe von *Omirou (2012)*, die N-Düngung nebensächlich (Tab. 9-12). Da Nitrile rein N- und nicht S-haltig sind, wäre theoretisch mit hoher N-Düngung ein weiterer Anstieg der Nitrile zu erwarten gewesen (*Omirou et al., 2012*). Betrachtet man die individuellen Nitrile, ist IACN ein hervorragendes Beispiel für einen unverkennbaren N-Effekt (Abb. 4-10H). Dieser hebt sich jedoch bei Betrachtung der Gesamt-Nitril-Konzentration wieder auf, da die beiden anderen Nitrile (2PE- und 4Pent-CN) keinen N-Effekt besaßen. Zudem ist 4-Pent-CN der Nitril-Hauptvertreter in *Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* (*Kallabis-Rippel, 2000, S. 208*). Generell besteht die Gefahr, dass während der GLS-HP-Analyse am GC die Komposition der Hydrolyseprodukte stark beeinflusst wird. Eine Säulentemperatur von $200^\circ C$ führt zur GLS-Hydrolyse zu überwiegend Nitrile (44–63%) und weniger ITC (13–32%) (*MacLeod et al., 1981*). Die Dekomposition kann bis zu einer Mindesttemperatur $125^\circ C$ stattfinden, darunter findet keine Dekomposition statt (*MacLeod et al., 1981*). Unter Myrosinase-gesteuerten Bedingungen entsteht aus indolischen GLS Indolyl-Methyl-ITC, welches weiter zu I3C reagiert (*Agerbirk et al., 1998*). Jedoch steuert das in der FM vorliegende ESP die Hydrolyse in Richtung der IACN-Synthese, welches die Hypothese bestätigt, dass ESP in hoher Konzentrationen im Pflanzenmaterial vorlag und die Hydrolyse dominierte (Abb. 4-10H). Zudem kann IACN weiter zu IES, welches kein GLS-HP sondern ein Phytohormon ist (*Halkier and Gershenzon, 2006*). Dessen Synthese wird insbesondere unter S-Mangelbedingungen gefördert, um möglicherweise das Streckenwachstum zu fördern (*Bartel and Fink, 1994; Kutz et al., 2002*). Das Resultat ist eine dezimierte GLS-HP-Konzentration (Tab. 9-10).

Epithionitrile sind die GLS-HP mit den höchsten Konzentration im Pflanzenmaterial (Tab. 9-10). Sie waren im Vergleich zu den ITC und Nitrilen um den Faktor zehn erhöht. Die Erklärung ist, dass im frischem Pflanzenmaterial ESP die GLS zu überwiegend Epithionitrile hydrolysieren, während hingegen in getrocknetem Material vermehrt ITC entstehen (*Holst und Williamson, 2003*). Das liegt daran, dass ESP während eines längeren Trocknungsvorganges zerstört wird (*Lambrix et al., 2001*). Für die GLS-HP-Analyse wurde FM gewählt, weshalb ESP die hydrolytischen Schritte zur Epithionitril-Synthese einleiten konnte. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von ESP und Myrosinase, ist die ESP-Aktivität dominanter (*Vos et al., 2008*) und vermehrt ESP-gesteuerte Hydrolyseprodukte entstehen. Zudem ist der Effekt der S-Düngung deutlich in drei Stufen verlaufen und hoch signifikant, jedoch nur unter einer niedrigeren N-Gabe (Abb. 4-8D). Der S-Effekt lässt sich dadurch erklären, dass Epithionitrile nichts anderes als S-haltige Nitrile sind und entsprechend ähnlich wie ITC auf die Düngung reagieren (*Bones and Rossiter, 2006*). Die Epithionitrile wurden nicht N-düngungsabhängig beeinflusst (Abb. 4-8D, Tab. 9-12). Zudem ist unter hohem S-Angebot die Myrosinaseaktivität reduziert, da die Pflanze unter solchen Bedingungen keinen Anlass der S-Remobilisation aus den GLS hat (*Gerendás et al., 2009*). Während der Probenanalyse wurde mittels einer pH-Elektrode (Orion Research Incorporated, USA) im zerkleinerten Pflanzenmaterial ein pH-Wert von 6,5 bestimmt, welcher für die Nitrilsynthese zu basisch ist. Für die ITC-Synthese wäre der pH-Wert optimal, jedoch scheint der ESP-Einfluss zu überwiegen, weshalb vermehrt Epithionitrile synthetisiert wurden (*Holst and Williamson, 2004*). Diese Vielzahl an Erklärungsansätzen liefert den Grund für die Überzahl ESP-hydrolysierter Epithionitrile.

Das ITC/Nitril-Verhältnis ist ein optimaler Maßstab zur Bestimmung der gesundheitsfördernden Wirkung eines pflanzlichen Nahrungsmittels. Wie bereits beschrieben, werden ITC aufgrund ihrer nachgewiesenen antioxidativen Wirkung den Nitrilen bevorzugt. Aus gesundheitsfördernder Sicht ist es demnach das Ziel ein möglichst hohes ITC/Nitril Verhältnis. Dieses konnte im Versuch infolge der höchsten S- und der niedrigeren N-Düngung erzielt werden ($S2N1 = 0,703$) (Tab. 9-10). Infolgedessen ist auf eine hohe N-Düngung zu verzichten, da diese das ITC/Nitril-Verhältnis nachweislich wieder um mehr als die Hälfte reduzierte ($S2N2 = 0,383$) (Abb. 4-9A). Keine Forschungsarbeit hat sich bisher mit solch einem Verhältnis befasst und dessen Wichtigkeit offengelegt. Um diese Erkenntnis vergleichen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen. Ein erster sinnvoller Ansatz wäre die Aufstellung des ITC/Nitril-Verhältnisses an verschiedenen

Brassicaceae-Sorten oder unter einem anderen N- und S-Angebot, um die Thematik näher beleuchten zu können.

Es stellt sich verständlicherweise nun die Frage, ob die im Pflanzenmaterial detektierten GLS mit den entsprechenden GLS-HP überhaupt korrespondieren, denn schließlich stehen beide Metabolite durch einen zwischengeschalteten Hydrolyse-Schritt in Abhängigkeit zueinander. Die im Versuch detektierten GLS und die entsprechenden detektierten GLS-HP wurden tabellarisch aufgelistet (Tab. 9-14). Da überwiegend GBC, GNP, GB und GNI synthetisiert wurde, dominierte das GLS-HP-Muster durch die entsprechenden GLS-HP (Epi-, 4Pent-ITC, -CN; Epi-, 3But-ITC, 2PE-ITC, -CN). Aufgrund der bereits geringen Konzentration an GI, PRO, GRA und GRE lagen vermutlich die entsprechenden GLS-HP in nicht detektierbaren Konzentrationen vor. Insbesondere für PRO ist dies von großem Vorteil, da das daraus resultierende GLS-HP Goitrin (5-Vinyloxazolidin-2-thion) kanzerogene und toxische Eigenschaften besitzt (*Booth et al.*, 1990). Deswegen ist es in Nutzpflanzen eher unerwünscht, jedoch ist dessen goitrogene Wirkung auf den Menschen noch nicht bestätigt (*Mithen*, 2001). Für dessen Abwesenheit würde sprechen, dass es ein äußerst instabiles ITC mit zyklischer Verbindung ist, welches weiter abgebaut wird (*Gronowitz et al.*, 1978) wie auch *Ettlinger et al.* (1950) nachweisen konnten. Die indolischen GLS wurden allesamt überwiegend zum Nitril IACN hydrolysiert und nicht dem entsprechenden ITC (Indolyl-Methyl-ITC). Das zweite Hydrolyseprodukt der indolischen GLS (Indol-3-Carbinol) war nicht detektierbar, da es eine flüchtigere Substanz ist, und erklärt somit dessen Abwesenheit im Pflanzenmaterial (*Vos et al.*, 2008).

5.2 Auswirkung der Se-Blattapplikation auf in Pak Choi erfasste Parameter mit besonderem Fokus auf GLS und GLS-HP

Der Versuchsteil der Blattapplikation diente der Untersuchung des Effektes von Se auf die GLS und deren Hydrolyseprodukte im Pak Choi Pflanzenmaterial. Zudem sollte untersucht werden, ob und inwiefern S mit Se interagiert und das Muster und die Konzentration der GLS und GLS-HP reduziert wurde.

5.2.1 Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf Frisch- und Trockenmasse

Die Bestimmung der Biomasse ist ein geeigneter Indikator für die Ermittlung einer toxischen Se-Applikationsgrenze für Pak Choi. Denn es zeigte sich im Versuch, dass bei einer Blattapplikation von 2 mg Se/Pflanze die FM anstieg und abschließend mit höherer Se-Konzentration wieder sank (Abb. 4-11A). Se hat positive Einflüsse auf Wachstum und Entwicklung der Pflanze (*Germ et al.*, 2007), jedoch nur bis zu seiner Toxizitätsgrenze (>10 mg/kg) (*Ríos et al.*, 2009; *Xue et al.*, 2001) (*Ríos et al.*, 2009). Anders als *Hsu et al.* (2011) wurde im Versuch eine Se-abhängige FM-Änderung nachgewiesen (Abb. 4-11A). Die Erkenntnis sinkender Biomasse mit extremer Se-Konzentration wird durch die Arbeitsgruppe von *Xue* (2001) bestätigt. Die FM bewegte sich in einem Bereich, welcher auch im ersten Versuchsteil variiertes N- und S-Düngung erfasst werden konnte. Der Verlauf der TM verhielt sich ähnlich dem der FM (Abb. 4-11B). Somit lag das Gewicht der TM stets proportional zu dem der FM (Abb. 4-11A, B) und ein Verdünnungseffekt trat nicht in Erscheinung.

5.2.2 Einfluss der Selen-Applikation auf S-, N- und Se-Gehalt in Pak Choi

Wie erwartet blieb die N-Konzentration von der Se-Blattapplikation unbeeinflusst (Abb. 4-12A). Die Konzentration lag wie auch im ersten Versuchsteil der variierten N- und S-Düngung durchgehend in einem Bereich von 3,1–3,7% N mit einer Düngung von umgerechnet 1 g N/Gefäß. Diese N-Düngung liegt somit im mittleren Bereich der im ersten Versuchsteil gedüngten N-Stufen N1 und N2. Bisher existieren keine Studien, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen Se und N aufdecken konnten.

Anders ist der Einfluss der Se-Blattapplikation auf die S-Konzentration. Die Lehrbuchmeinung, dass S und Se in einer Aufnahme- aber auch Verwertungskonkurrenz stehen und infolgedessen die S-Konzentration in der Pflanze reduziert ist (*Zayed and Terry*,

1992), wurde hier widerlegt (Abb. 4-12B) (Hsu et al., 2011). Se stimuliert die Genexpression diverser HAST-verantwortlicher Gene, wodurch der S- und Sulfatlevel in der Pflanze steigt (Hsu et al., 2011; Kopsell et al., 2009; Kopsell and Kopsell, 2007; Yoshimoto et al., 2007). Die Begründung liegt hier nicht nur in einer erhöhten S-Aufnahme über HAST sondern auch einem erhöhten Root-to-Shoot-Transfer (Hsu et al., 2011), da infolge der Blattapplikation die Aufnahmekonkurrenz umgangen wurde. Im Versuch wurden umgerechnet 0,480 g S/10L Nährlösung gedüngt und ist vergleichbar mit der höchsten S-Düngung im Versuch V1.3. (Tab. 3-2:). Da die S-Düngung im Se-Versuch etwas höher war, fielen demzufolge die S-Gehalte höher aus (0,62–1,17%) (Tab. 3-2, Abb. 4-12B).

Die Aufnahme, Reduktion und Assimilation vom Se interagiert stark mit S (Anderson and McMahon, 2001) (siehe Kapitel 1.2). Infolgedessen benötigt Se ausreichend S, um assimiliert zu werden (Zayed and Terry, 1992). Im Versuch konnten signifikant ansteigende Se-Konzentrationen mit steigender Se-Blattapplikation erfasst werden (Abb. 4-12D). Die Se-Blattapplikation in Form von Selenat war zudem überaus geeignet, da insbesondere Selenat zur Se-Akkumulation im Blatt führt, während Selenit bevorzugt eine Se-Akkumulation in der Wurzel auslöst (Hsu et al., 2011). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Selenat anders als Selenit in der Pflanze mobil ist (Hsu et al., 2011) und somit in die benötigten Regionen, wie beispielsweise jüngeres Blattmaterial der Pflanze, transportiert werden kann (Germ et al., 2007). Zudem erwies sich Pak Choi als *Brassicaceae*-Gewächs als äußerst effektiv, denn eine Vielzahl anderer Pflanzen ist nicht in der Lage Se aufzunehmen und zu akkumulieren (Nowak et al., 2004). Auf die gesamte Pflanze zurückgerechnet wurden 50% der applizierten Se-Konzentration im Pflanzenmaterial detektiert (Abb. 4-12D). In der Kontrolle lagen die Konzentrationen leicht über dem Nullbereich (0,14 mg/kg TM). Ein absoluter Mangel ist nur unter strengsten Bedingungen durchzuführen, welche im Gewächshaus nicht durchsetzbar sind. Dennoch wurde akribisch auf mit 6%iger HNO₃ angesäuertes Material geachtet. Zudem ist ein bedeutender Vorteil einer Gewächshausanzucht, dass die Kreuzkontaminierung mit in der Luft befindlichem Se (Dimethyl-Se) in den Kontrollpflanzen deutlich reduziert (Seppänen et al., 2010) und folglich Verfälschungen der Se-Aufnahme auf ein Minimum konzentriert werden können.

Die durchschnittliche Se-Konzentration in *Brassica pekinensis* liegt bei 36,4 µg/g TM (5,8–72,2) (Yang et al., 1983) und konnte im Versuch mit 2 mg Se im Versuch (25,83 µg/g TM) erreicht werden (Tab. 9-16D). Im Pflanzenmaterial konnten bis zu 442 mg Se/kg TM ohne Anzeichen toxischer Symptome detektiert werden (Tab. 9-16D). Pak Choi ist zwar eine

sekundär-Se-akkumulierende Pflanze und kann auf Se-reichen Böden (2–4 mg Se/kg) bis zu 1.000 µg Se/g TM ohne Ausbildung toxischer Anzeichen akkumulieren (Marschner, 1995, S. 431). Möglicherweise wurde insbesondere Selenat nach der Aufnahme über das Blatt schnell in organische Se-Spezies eingebaut und somit dessen toxische Wirkung gehemmt (Kápolna et al., 2012). Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass sich die höheren Se-Applikationen speziell für Pak Choi dennoch im kritischen Toxizitätsbereich bewegten, denn laut der Arbeitsgruppe von Xue et al. (2001) bewirkt einer Se-Gabe von >10 mg/kg pro-oxidative Se-Wirkungen. Allmählich treten metabolische Gegenmechanismen der Pflanze in Kraft (weiteres dazu siehe Kapitel 5.2.4). Dabei wird die Respirationsrate und folglich die Abgabe des Dimethyl-Se über die Stomata erhöht (Lyons et al., 2009), welches um das 600fache weniger toxisch ist als anorganisches Se (de Souza et al., 2002). Insbesondere *Brassica* sind charakteristisch für eine hohe Abgabe flüchtiger Bestandteile über die Stomata. Bis zu 500 µg Se/m² können täglich abgegeben werden (Ye et al., 2003). Demnach ist es denkbar, dass im Versuch die applizierte Se-Konzentration pro-oxidative Mechanismen hervorrief und die Respirationsrate als auch antioxidative Mechanismen stimuliert wurden (Germ et al., 2007). Diese Abgabe von flüchtigen Se-Metaboliten über die Stomata würde zusätzlich erklären, weshalb nur rund 50% der applizierten Se-Lösung im Pflanzenmaterial detektiert werden konnten. Somit befand sich laut Se-Analyse die Se-Konzentration unter der Toxizitätsgrenze (Abb. 4-12D). Die Synthese von Se-Proteinen unterstützt die Auslösung einer Toxizität in der Pflanze (Ellis and Salt, 2003). Die Detektion von nur 50% der tatsächlich applizierten Se-Konzentration wird zudem durch die These unterstützt, dass laut vereinzelter Hinweise S reduzierende Effekte auf Se auslöst: Beispielsweise konnte in Broccoli durch eine gesteigerte SO₄²⁻-Konzentration (0,25 auf 10 mM) der SeO₃²⁻-Gehalt um 33% reduziert werden (Zayed et al., 1998). Zudem wies die Arbeitsgruppe von Hsu et al. (2011) nach, dass Se die Genexpression der S-Transportergene in der Wurzel (SULTR1;1 und SULTR1;2) bis auf das 60fache stimuliert, wodurch die S-Aufnahme erhöht und die Schere zwischen beiden Nährstoffe weiter geöffnet wird.

5.2.3 Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf die in Pak Choi erfasste Konzentration und Muster der Glucosinolate

Bisher wurde die Hypothese aufgestellt, dass simultan hohe GLS- und Se-Gehalte durch metabolische Interferenzen von S und Se während der Aufnahme als auch der Assimilation schwierig zu erreichen sind (siehe unter Kapitel 1.1) (Finley et al., 2005; Hsu et al., 2011). Die Resonanz kann eine Reduktion der GLS-Konzentration sein. Mit Hilfe der

Blattapplikation konnte die Problematik der Aufnahmekonkurrenz umgangen werden. Jedoch nicht die Konkurrenz in der S-Assimilation im pflanzlichen Organismus. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass die GLS-Konzentration infolge der Se-Applikation nicht erhöht wurde, was erstere Ergebnisse bestätigt. Hingegen wurde die Konzentration jedoch auch nicht gesenkt (Abb. 4-13A). Vielmehr verlief sie konstant und daher Se-unabhängig. Es spielte folglich keine Rolle wie hoch die Se-Konzentration war, denn auch eine äußerst hohe Se-Blattapplikation führte zu keinen statistisch signifikanten Ergebnissen (Tab. 9-16). Auch die Forschungsgruppe von *Hsu et al.* (2011) konnten in Broccoli mit einer Se-Blattapplikation welche im Versuch der Se-Düngung Se₂ entspricht (2 mg/Pflanze) keine signifikanten Einflüsse auf GLS nachweisen.

Eine Erklärung für die Se-unbeeinflusste GLS-Konzentration ist, dass mit einer hochdosierten Se-Blattapplikation (400 g Se/ha) der Anteil essentieller und nicht-essentieller AS sinkt und somit weniger für die GLS-Synthese zur Verfügung steht (*Ježek et al.*, 2011). Infolgedessen hätte der GLS-Anteil mit steigender Se-Applikation sinken müssen. Jedoch wurde im vorliegenden Versuch ausreichend S für den pflanzlichen Metabolismus und die GLS-HP-Synthese geliefert (Abb. 4-12B). Die Vermutung liegt nahe, dass in GLS nur S eingebaut wurde, und aufgrund der stets konstanten S-Düngung keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten (Tab. 9-16). Somit ist es durchaus denkbar, dass aufgenommenes Se nicht in eine für Se-Metabolite übertragbare Form umgewandelt wurde. Da die Erkenntnisse zu Pak Choi als sekundär-Se-akkumulierende Pflanze noch lückenhaft sind, kann der präzise Grund noch nicht ausgemacht werden. Das in Form von Se-Cys vorliegende Se könnte nicht in Se-Meth sondern überwiegend in nicht-proteinogene Komponenten (z.B. Se-Meth-Se-Cys) eingebaut worden sein. Diese können nicht in Se-haltige Metabolite inkorporiert werden (*Zayed and Terry*, 1992). Der Effekt konnte in den sekundär-Se-akkumulierenden Pflanzen *Brassica oleracea* (Broccoli) bestätigt (*Pedrero and Madrid*, 2009). Andererseits aber in *Brassica rapa* var. Hilight (Raps) und *Brassica napus* 4021 (Rübsen) widerlegt werden (*Seppänen et al.*, 2010). Daher ist noch zu klären, wie die Se-Akkumulation und die entsprechenden Mechanismen speziell in Pak Choi verläuft, da sortenspezifische Unterschiede zu existieren scheinen. Zudem kann aufgenommenes Se in volatile Organoselenide (z.B. Dimethyl-selenosulfide, -diselenide) inkorporiert werden (*Matich et al.*, 2012). Der für die GLS-Synthese mögliche Se-Pool ist dementsprechend wiederum reduziert.

Dass Seleno-GLS von der Pflanze synthetisiert werden können, wurde 1988 erstmalig bestätigt (*Bertelsen et al.*, 1988) und steigert somit die Chance, dass im Versuch Se-GLS im

Pflanzenmaterial synthetisiert wurden. Se kann wie bereits erwähnt an zwei bzw. in Alkylthioalkylen an drei Stellen in GLS anstelle des S inkorporiert werden (*Holst and Williamson, 2004*). In GLS scheint Se jedoch überwiegend in das S-haltige Derivat des Meth eingebaut zu werden, während weniger an Stelle der β -Thioglucose bindet (*Matich et al., 2012*). Basierend auf dieser Erkenntnis müsste mit einer Se-Applikation das Muster zu vermehrt aliphatischen und weniger aromatischen oder indolischen GLS verschoben werden. Weiteres speziell zum Muster der GLS ist zum Ende des Kapitels zu lesen. Es wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten die Lokalisation des in GLS-HP inkorporierten Se unter den in der Arbeit festgelegten S- und Se-Konzentrationen speziell für Pak Choi zu analysieren.

Die HPLC-Methode ist zur Identifikation und Quantifizierung von SeGLS gut geeignet (*Bertelsen et al., 1988*). Eine kleine Schwachstelle besitzt sie dennoch, denn während der Probenaufbereitung wird Sulfatase zur enzymatischen Sulfat-Abspaltung verwendet, um letztendlich Desulfo-GLS zu erhalten (siehe Kapitel 0). Besteht also der Fall, dass das in GLS eingebaute Se anstelle des Sulfatesters tritt, kann dieses nicht zu einem Desulfo-GLS hydrolysiert und mittels HPLC detektiert werden. Zudem können schwache Se-Verbindungen in der chromatographischen Säule eluiert werden und zu fehlerhaften Rückschlüssen führen (*Pedrero and Madrid, 2009*).

Eine weitere Erklärung für die düngungsunabhängige GLS-Konzentration wäre, dass Se vermutlich in GLS eingebaut wurde – jedoch ohne akkumulierenden Effekt auf die GLS-Konzentration. Vielmehr wurde das in GLS inkorporierte S durch Se ausgetauscht (*Bertelsen et al., 1988*). Eine moderate Se-Konzentration (S2) steigert die S-Aufnahme und folglich die Cys-Synthese (*Hsu et al., 2011; Kopsell et al., 2009; Yoshimoto et al., 2007*). Dementsprechend kann theoretisch die GLS-Synthese ansteigen. Zu hohe Se-Konzentrationen (400 g/ha) resultieren jedoch wiederum in einer signifikanten Reduktion der Meth-Gehalte (*Ježek et al., 2011*), wodurch insbesondere die Synthese Meth-haltige (aliphatische) GLS herabgesetzt werden kann (Abb. 4-13A).

Aufgenommenes Se wird überwiegend in SeMeth-SeCys (90,9%), Selenit (6,1%) und unbekannte Se-Formen (3,0%) metabolisiert (*Sugihara et al., 2004*), während SeMethyl und γ -Glutamyl-Se-methylselenocystein nicht im Pflanzenmaterial detektiert wurden (*Sugihara et al., 2004*). Laut *Seppänen et al. (2010)* wurden hingegen in *Brassica* hohe Konzentrationen an Se-Meth (85%) und teils SeO_3^{2-} detektiert. Das über das Blatt applizierte Na_2SeO_4 wurde sofort in Se-Meth metabolisiert (*Seppänen et al., 2010*). Zudem wird deutlich, dass infolge des Blattalters vermehrt anorganisches Se (91%) beinhaltet,

während junges Blattmaterial Se in organischer Form (90–95%) bevorzugte (*Cakır et al.*, 2012, S. 214–215). Hier werden wieder die katabolischen Abbauprozesse mit fortschreitendem Alter verdeutlicht. Da die Anzucht des Pak Chois so praxisnah wie möglich verlaufen sollte, wurden die Pflanzen zu einem Alter geerntet, wie es auch in der Agrikultur üblich ist (50–60 Tage) (*Kallabis-Rippel*, 2000, S. 10). Zu diesem Zeitpunkt konnte durch die SPAD-Analyse in Versuch V1.3. verdeutlicht werden, dass dort der Abbauprozess bereits in vollem Gange war und die GLS-Konzentration herabgesetzt wurde (Tab. 9-6, Tab. 9-16).

Nach Anwendung des Vektor-Diagramms nach *Koricheva* (1999) zur graphischen Darstellung der Düngungseffekte auf die Konzentration von Inhaltsstoffen erscheint es auf den ersten Blick, dass eine Se-Applikation zu Veränderungen der GLS-Konzentration führt (Abb. 9-9). So verursacht eine Se1-Applikation eine reduzierte Synthese, mit einer weiteren Se-Steigerung zu einem Verdünnungseffekt. Im Vergleich der Se2- zur Se3-Applikation scheint die GLS-Konzentration aufgrund reduzierter Synthese zu sinken, welche wiederum infolge der Se4-Applikation eine Synthesesteigerung erfährt. Jedoch ist hier stets zu berücksichtigen, dass jegliche Se-Effekt nicht signifikant waren (Tab. 9-16) und somit die Blattapplikation letztendlich keinen düngungsspezifischen Effekt zu haben scheint.

Eine weitere Begründung für die unbeeinflusste GLS-Konzentration könnte sein, dass die Pflanzen mit 8 Tagen nach der letzten Blattapplikation zu frühzeitig geerntet wurden. Vermutlich hätte der Se-Effekt zu einem späteren Zeitpunkt einen signifikanteren Einfluss gehabt. Laut *Hsu et al.* (2011) sank der GLS-Gehalt erst 3 Wochen nach der letzten Applikation. Jedoch wurde in einem Se-Experiment an einer mit Pak Choi näher verwandten Pflanze (*Brassica oleracea*) erwiesen, dass selbst nach vier Wochen die GLS-Konzentration unbeeinflusst verlief: weder eine Reduktion noch eine Erhöhung der GLS trat in Erscheinung (*Hsu et al.*, 2011). Zudem beweist die Se-Analyse an der ICP-MS, dass definitiv Se vom Blatt aufgenommen und in den pflanzlichen Metabolismus inkorporiert wurde (Abb. 4-12D).

Bei Betrachtung der klassifizierten GLS in aliphatisch, aromatisch und indolisch (Abb. 4-13B, C, D) wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede deutlich. Se scheint nach Datenauswertung und Interpretation des Versuches in Bezug auf die GLS keinen erheblichen Einfluss zu besitzen. Alle im Versuch detektierten individuellen GLS konnten nicht durch die Se-Applikation beeinflusst werden.

Eine signifikante Ausnahme stellten hier die zwei indolischen GLS GBC und 4OH dar, welche durch moderate Se-Applikation (2 bzw. 20 mg/Pflanze) reduziert wurden (Abb. 4-14). Durch eine Se-Applikation von 48 μM wurden im Pflanzenmaterial 731 $\mu\text{g Se/g TM}$ und eine 69%ige Reduktion indolischer GLS im Pflanzenmaterial gemessen (Charron *et al.*, 2001). Hingegen detektierten Robbins *et al.* (2005) durch 100 ppm Se in Broccoli eine gesteigerte Konzentration indolischer GLS (+4%). Interessanterweise konnten sie durch eine deutliche Steigerung der Se-Düngung (10.000 ppm) keinen weiteren Anstieg oder Abfall indolischer GLS aufdecken (Robbins *et al.*, 2005). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass beide Arbeitsgruppen die Se-Düngung über Nährlösung der Pflanze zuführten. Beim Vergleich der Versuchsergebnisse mit einem weiteren Blattdüngungsversuch fiel auf, dass bezüglich der aliphatischen GLS sich ein Widerspruch ergab: Das über das Blatt applizierte Se (2 und 20 mg/Pflanze) führte zu einer Aufkonzentrierung des aliphatischen GLS GRE (Hsu *et al.*, 2011). Im Versuch wurden alle aliphatischen GLS nicht signifikant beeinflusst (Abb. 4-13B). Bei genauerer Betrachtung der unter der Rubrik der aliphatischen GLS klassifizierten Alkylthioalkyle fällt auf, dass insbesondere GI und GRE eine leichte Tendenz in Richtung einer Konzentrationssteigerung mit steigender Se-Applikation aufwiesen (Abb. 4-14A, I). Als Alkylthioalkyle bieten sie im Gegensatz zu den in der Rubrik zugehörigen Olefinen sowie den aromatischen und indolischen GLS gleich drei mögliche Angriffspunkte für die Se-Inkorporation an (Holst and Williamson, 2004; Pedrero and Madrid, 2009). Neuste Erkenntnisse unterstützen eine durch Se zunehmende Konzentration aliphatischer GLS, da Se bevorzugt im Meth-Derivat vorlag und weniger in der Sulfatgruppe oder der β -Thioglucose (Matich *et al.*, 2012). Generell lässt sich diese Entwicklung dadurch erklären, dass mit moderater Se-Konzentration (Se_2) vermehrt S aufgenommen wird und folglich die Cys-Synthese (Hsu *et al.*, 2011; Kopsell *et al.*, 2009; Yoshimoto *et al.*, 2007) und auch die Meth-Synthese stimuliert werden. Unter diesen Bedingungen würde die Synthese aliphatischer, indolischer und aromatischer GLS steigen. In einem Blattdüngungsversuch von Ježek *et al.* (2011), welche das AS-Muster unter verschiedenen Se-Stufen untersuchten, konnte mit einer Erhöhung der Se-Konzentration das AS-Muster verändert werden: hohe Se-Konzentrationen (im Feldversuch 400 g/ha) führten zu einer signifikanten Reduktion der Meth-Gehalte aber Stimulation von Cys (Ježek *et al.*, 2011). Infolgedessen liegt ausreichend Cys vor, um die GLS-Synthese überhaupt starten zu können, jedoch weniger Meth. Es kommt zu einer Musterverschiebung mit einer reduzierten Konzentration aliphatischer und evtl. erhöhten Konzentration indolischer GLS. Im Versuch wurden zwar im Vergleich zur Se_2 -Düngung wieder vermehrt indolische GLS synthetisiert, die aliphatischen GLS wurden jedoch nicht signifikant durch Se beeinflusst und waren

durchgehend die am meisten synthetisierten GLS (Abb. 4-13A). Jedoch bedarf der Se-Effekt auf das AS-Muster weiterer Forschung (Ježek *et al.*, 2011).

5.2.4 Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf Konzentration und Muster der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte in Pak Choi

Die Auswirkungen einer Se-Blattapplikation in Pak Choi auf die GLS-HP sowie das Muster aus den individuellen GLS-HP wurden nach intensiver Literaturrecherche noch von keiner Arbeitsgruppe untersucht. Demzufolge stellt dieses Kapitel einen weiteren zentralen Interessenschwerpunkt der Arbeit dar.

Se kann tatsächlich Bestandteil der GLS-HP werden und mittels der GC-MS-Methode detektiert werden (Bertelsen *et al.*, 1988). Beeindruckend ist die immens gestiegene GLS-HP-Synthese mit einer Se-Applikation von 2 mg Se/Pflanze, welche unter hoher Se-Applikation wieder absank (Abb. 4-15A). Verglichen mit V1 wurde die GLS-HP-Höchstkonzentration mit 3,41 $\mu\text{mol/g}$ FM mehr als verdoppelt (Tab. 9-10). Die Forschungsgruppe von Bertelsen *et al.* (1988) wies nach, dass der Anteil Se-haltiger GLS-HP äußerst gering ist. So war trotz hoher Se-Gabe (100 mg/L) und 80 mg S/L das Verhältnis von 3But-ITC:3But-Isoselenocyanat bei 2000:1 (Bertelsen *et al.*, 1988). Sie argumentierten, dass die geringe Se-Inkorporation in GLS auf die Fähigkeit der Pflanze rückschließen lässt, die chemische nicht-Äquivalenz zwischen S und Se erkennen zu können. Hingegen führte eine Se-Applikation in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) und Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) zu einer deutlichen Akkumulation der GLS-HP (Matich *et al.*, 2012), wie auch im Versuch in Se2 bestätigt werden kann (Abb. 4-15A). Bis zu 78% der Hydrolyseprodukte waren Se-haltig, während der Anteil der Seleno-GLS nur bei 15,5% lag (Matich *et al.*, 2012).

Interessanterweise deckte die Anwendung des Vektordiagrammes nach Koricheva (1999) auf, dass der konzentrationssteigernde Effekt der GLS infolge der Se-Applikation einer gestiegenen Synthese zu verdanken ist (Abb. 9-9). Sobald jedoch die Se-Applikation die 2 mg Se-Grenze überschritt, kam es zu einer deutlichen Effekt einer Synthesereduktion (Abb. 9-9). Im Folgenden werden die Gründe für diesen Effekt beschrieben.

Die Arbeitsgruppe von Sams *et al.* (2011) stellte eine bemerkenswerte Hypothese auf: Auf genetischer Ebene soll Se durch Hochregulierung des Gens AT1G54040 nicht nur die GLS-Biosynthese, sondern auch die GLS-Hydrolyse in die jeweiligen GLS-HP im noch intakten Pflanzenmaterial stimulieren (Sams *et al.*, 2011). Die Hydrolysestimulation würde somit

erklären, weshalb die GLS-Konzentration durch die Se-Blattapplikation nicht signifikant beeinflusst wurde, da GLS vermehrt zu GLS-HP hydrolysiert wurden, sobald mehr Se appliziert wurde (Abb. 4-15A). Diese Hypothese liefert somit den Grund der mit bis zu 2 mg Se/Pflanze gestiegenen GLS-HP-Gehalt. Zudem spielt die Lichteinwirkung eine zentrale Rolle. Unter hohem Lichteinfluss wird die Sulfat-Reduktion stimuliert, da durch die erhöhte Photosynthese vermehrt Fd(ox) für die Sulfatreduktion zu Sulfit geliefert wird (*Marschner*, 1995, S. 257). Eine hohe Sulfatreduktion erhöht zudem die GSH-Konzentration. Bei hohem Se-Level kann auch Se in GSH eingebaut werden. Da GSH als S- bzw. Cys-Pool dient, kann auch Se-GSH die für die GLS-HP-Synthese nötigen Bausteine liefern (*Cakır et al.*, 2012, S. 213–124; *Schlaeppli et al.*, 2008). Da in der Kontrolle ausreichend S gedüngt wurde, konnten GLS-HP auf diese S-Quelle Se-unabhängig zurückgreifen. Dies kann ein Grund für die nicht herabgesetzte Konzentrationen sein (Abb. 4-15A). Hingegen konnte durch eine höhere Se-Applikation der Pool für die GLS-HP-Synthese erweitert werden (Tab. 9-14A). Neben S-haltigen AS wurden zudem Se-haltige Quellen (z.B. Se-Meth) in die Hydrolyseprodukte eingebaut und deren Konzentration signifikant gesteigert (Abb. 4-15A).

Eine entscheidende Frage ist, weshalb die GLS-HP-Konzentration ab einer erhöhten Se-Applikation von über 2 mg Se/Pflanze wieder sank. Anders als bisher vermutet, zeigte die Arbeitsgruppe von *Schlaeppli et al.* (2008) durch radioaktiv markierten ³⁵S, dass GLS-HP überwiegend reduziertes S aus GSH und nicht wie bisher vermutet aus Cys ziehen. Dieses Erkenntnis liefert für den Versuch die Erklärung, weshalb unter erhöhter Se-Blattapplikation die Konzentration der GLS-HP wieder sank (Abb. 4-15A). Denn unter einer hohen Se-Applikation von über 10 mg/kg wirkt Se pro-oxidativ (*Xue et al.*, 2001). Erste Anzeichen oxidativen Stresses manifestierten sich, dem die Pflanze durch erhöhte GSH- und GPx-Synthese entgegenwirkt (*Theml*, 2005, S. 16–23). GPx ist ein Selenoenzym, besteht letztendlich aus vier Se-Atomen (z.B. in Form von SeCys) und katalysiert die GSH-Detoxifizierung reaktiver Elektrophile, indem er als e⁻-Donor agiert (*Marschner*, 1995, S. 433). Somit könnten die potentiellen S- und Se-Quellen für die Enzymsynthese den GLS-HP entzogen worden sein. Mit der Hypothese, dass GSH der S-Donor für die GLS-HP-Synthese ist, kann gefolgert werden, dass durch GST (welches auf Transkriptionsebene mittels GLS-HP vermehrt synthetisiert wird) die Aldoxim-Konjugation zu den GLS und entsprechend den GLS-HP katalysiert wird und eine gegenseitige Abhängigkeit besteht (*Sønderby et al.*, 2010). Zudem stimuliert Se die GPx Aktivität in den Mitochondrien (*Germ et al.*, 2007).

Es ist stets zu berücksichtigen, ob es sich um eine nicht-, sekundär- oder Se-akkumulierende Pflanze handelt, da diese wie bereits erwähnt unterschiedliche Mechanismen der Se-Assimilation besitzen. Se-Akkumulierer inaktivieren Se in Form von Se-Cys über den S-Metabolismus in nicht-strukturelle AS und Proteine oder lagern diese in der Zellwand ein (Polatajko *et al.*, 2004). Auf diese Weise wird eine Se-Akkumulation ohne toxische Folgen möglich (Ximénez-Embún *et al.*, 2004). In Se-Akkumulierern wird dieser Weg des Proteineinbaus von Se umgangen, indem nicht-proteinogene oder nicht-essentielle Se-Metabolite wie z.B. SeMeth-SeCys synthetisiert wird (Marschner, 1995, S. 432; Zayed *et al.*, 1998; 1992). Jedoch ist der präzise Mechanismus sekundär-Se-akkumulierender Pflanzen noch unklar. Se-Cys entsteht überwiegend durch Inkorporation inorganischen Se (Burk, 1991) oder Transsulfuration aus SeMeth (Huysen *et al.*, 2003). SeCys akkumuliert jedoch nicht, sondern reagiert durch GSH oder SeCys- β -Lyase zu Selenid (Esaki *et al.*, 1981) und wird Bestandteil der GSH (Sønderby *et al.*, 2010). SeCys liegt im Pflanzenmaterial nie frei vor (Marschner, 1995, S. 256). Zudem wird durch die kurzzeitig erhöhte Cys-Konzentration APS inhibiert, wodurch weniger S und Se assimiliert und weniger S-haltige Metabolite (z.B. GLS) metabolisiert werden (Marschner, 1995, S. 256).

Während in Broccoli mehr Seleno-GLS, -ITC und -Nitrile detektiert wurden als deren S-Vertreter, wies Blumenkohl mehr S-haltige als Se-haltige GLS und GLS-HP auf (Matich *et al.*, 2012). Die Se-Inkorporation ist also nicht nur düngungs- sondern auch sortenabhängig. Um auf dieses Phänomen näher eingehen zu können, wurden die im Versuch detektierten GLS-HP in ITC, Nitrile und Epithionitrile klassifiziert. Das folgende Kapitel 5.2.5 geht auf diese Thematik näher ins Detail.

5.2.5 Auswirkung der Selen-Blattapplikation auf die in Isothiocyanate, Nitrile und Epithionitrile klassifizierten Hydrolyseprodukte in Pak Choi

Wie auch im ersten Versuchsteil wird im diesem Kapitel auf das Muster der GLS-HP klassifiziert in ITC, Nitrile und Epithionitrile näher eingegangen. Zudem werden die Effekte der Se-Blattapplikation auf die individuellen Hydrolyseprodukte erläutert.

Der Anteil der ITC stieg deutlich signifikant mit einer gesteigerten Se-Blattapplikation auf ein Maximum von 0,511 $\mu\text{mol/g}$ FM an (Tab. 9-16). Wie bereits im oberen Teil des Kapitels, existieren zahlreiche Ursachen für den immensen Anstieg, wie z.B. eine erhöhte GSH-Synthese durch stimulierte Photosynthese (Cakır *et al.*, 2012, S. 213–124; Schlaeppli

et al., 2008) oder Hochregulierung eines Gens, der die Hydrolyse im intakten Pflanzenmaterial stimuliert (*Sams et al.*, 2011).

Nachdem jedoch infolge der 2 mg Se der ITC-Maximalgehalt erreicht wurde, sank er ab einer Se-Applikation von 10 mg Se/Pflanze wieder ab (Abb. 4-15B), da ab diesem Moment Se pro-oxidativ wirken kann, wie auch die Arbeitsgruppe von *Xue et al.* (2001) nachwies. Neben den bereits erwähnten Effekten dezimierter ITC-Gehalte mit gesteigener Se-Applikation (siehe S.68), besteht die Möglichkeit, dass Se vorwiegend in ITC synthetisiert wurde, welche bei Raumtemperatur instabil sind und der Selenoxid β -Elimination unterliegen (*Matich et al.*, 2012). Unter einem höheren Se-Angebot ist diese Elimination erhöht und senkt die ITC-Konzentration, wie auch im Versuch unter erhöhter Se-Gabe verdeutlicht wurde (Abb. 4-15). Wie auch in Versuch V1 konnten die ITC 3But-ITC und 4Pent-ITC detektiert werden (Abb. 4-16A, B). Dessen Konzentration war in der Kontrolle nahe Null und wurde durch eine Applikation von 0,5 und 2 mg Se/Pflanze zunächst deutlich aufkonzentriert (Abb. 4-16A, B). Diese Akkumulation erklärt zudem den Konzentrationsanstieg der GLS-HP (Abb. 4-15A). Es besteht die Möglichkeit, dass sich Se in Form von Se-GSH in den GLS-HP-Vorstufen an Stelle der Sulfatgruppe befunden hat. Folglich konnte ein Anstieg Se-haltiger GLS mittels der HPLC-Methode nicht detektiert werden, jedoch deren Hydrolyseprodukte. Anders als im ersten Versuchsteil der variierten N- und S-Ernährung konnte kein 2PE-ITC in Pak Choi detektiert werden (Abb. 4-10, Abb. 4-16).

Die Arbeitsgruppe von *Matich et al.* (2012) konnte in Broccoli nur das S-haltige 2PE-ITC, jedoch kein Se-haltiges 2PE-ITC detektieren. Weshalb aber im Versuch auch unter Kontrollbedingungen kein 2PE-ITC detektiert wird bleibt noch zu erforschen.

Se-haltige Nitrile (Selenonitrile) wurden im Pflanzenmaterial des mit Se applizierten Pak Choi-Pflanzen nicht detektiert (Tab. 9-16). Auch die Kontrolle war Nitrilfrei, welches rückschließen lässt, dass durch die (im Vergleich zu Versuch V1) geringere N- aber höhere S-Düngung bevorzugt S-haltige GLS-HP synthetisiert wurden (Tab. 9-10B, C). Auch *Matich et al.* (2012) konnten in mit Se-gedüngtem Broccoli und Winterfutterraps keine Selenonitrile detektieren. Nitrile unterliegen generell geringem Forschungsinteresse, da deren bioaktive Wirkung weniger intensiv ausgeprägt ist als die der ITC. Zudem sind deren gesundheitsfördernden Eigenschaften noch widersprüchlich (*Keck and Finley*, 2004). Da jedoch bestätigt werden konnte, dass Selenonitrile bereits unter natürlichen Bedingungen ohne Se-Zusätze in der Pflanze synthetisiert werden (*Matich et al.*, 2012), sollten sie erst recht Beachtung finden und in Zukunft intensiver erforscht werden. Ob Selenonitrile

intensivere gesundheitsfördernde Wirkungen besitzen als deren S-haltigen Vertreter bleibt ebenfalls zu erforschen.

Die im Versuch dominierenden Epithionitrile erreichten Maximalgehalte von 2,90 $\mu\text{mol/g}$ FM und hoben sich damit signifikant von der Kontrolle als auch Se3 und Se4 ab, welche deutlich geringere Konzentrationen aufwiesen (Abb. 4-15C). Weshalb mehr Epithionitrile als ITC detektiert wurde kann dadurch erklärt werden, dass für die GLS-HP-Analyse frisches Pflanzenmaterial verwendet wurde. Das darin intakte ESP synthetisiert überwiegend Epithionitrile (*Holst and Williamson, 2004*). Zudem konnte auf genetischer Ebene in der Genmodellpflanze *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden, dass Se die Hydrolyse gezielt zu vermehrt Nitrilen und Epithionitrilen steuert (*Sams et al., 2011*). Die Epithionitrile Epi 3But und Epi 4Pent sind Abkömmlinge des 3But- und 4Pent-GLS aus denen ebenfalls die entsprechenden ITC (3But- und 4Pent-ITC) hätten synthetisiert werden können. Dies wurde jedoch aus den oben beschriebenen Gründen nur teilweise umgesetzt.

5.3 Anreicherung von GLS und GLS-HP durch eine Stickstoff- und Schwefeldüngung bzw. Selenblattapplikation: Eine Bewertung der Metabolitsteuerung aus gesundheitsfördernder Sicht

Die Kapitel des Diskussionsteils haben verdeutlicht, dass eine Anreicherung sowohl als Bodendüngung aber auch über das Blatt, die Synthese der GLS und auch die Hydrolyse zu den Abbauprodukten signifikant steuern kann.

Die durch eine höhere S- und niedrigere N-Düngung vermehrte Synthese aliphatischer GLS und weniger indolischer GLS führte zur Hydrolyse vermehrter ITC und teilweise Epithionitrile. Der Anteil der Nitrile wurde nur unter hoher N-Zufuhr deutlich erhöht. Aus krankheitspräventiver Sicht, ist dieser Effekt deutlich erwünscht: die antioxidative Wirkung sowie weitere krankheitspräventive Mechanismen durch ITC sind erwiesen, während Nitrile aufgrund ihrer nachweislich teils oxidativen Wirkung durchaus als unerwünscht eingestuft werden. Insbesondere Phenylethyl- und Butyl-ITC, welche im Versuch vermehrt detektiert wurden, sind effektive Induzierer von Phase II-Enzymen über den Nrf2-Signalweg (*Ernst et al.*, 2011). Durch Übertragung der in GLS-HP enthaltenen Thiolgruppe werden über eine längere Signalkaskade die Genexpression antioxidativer Enzyme stimuliert. Zudem lösen einige GLS-HP durch Induktion oder Inhibierung diverser Abläufe krebspräventive Mechanismen in der Karzinomentstehung aus.

Während der Se-Applikation wurden verglichen mit Versuch V1.3. weniger aliphatische aber dafür vermehrt indolische GLS synthetisiert. Dies könnte nach hydrolytischen Schritten zu eher unerwünschten Auswirkungen führen, denn es wäre ein deutlicher Anstieg indolischer GLS-HP (z.B. IACN) zu erwarten gewesen. Überraschenderweise wurden jedoch keine Nitrile aber vermehrt ITC und Epithionitrile synthetisiert. Aufgrund des antioxidativen und chemopräventiven Potentials der ITC ist dies durchaus eine positive Entwicklung. Eine Bioaktivität der Epithionitrile ist noch fraglich und wäre eine interessante Fragestellung für weitere Forschungsarbeiten. Eine gleichzeitige Se und S-Applikation kann neben konkurrierenden Effekten auch zur Qualitätssteigerung des Lebensmittels beitragen. So ist beispielsweise Se Bestandteil diverser zentraler Enzyme (Thioredoxin Reduktase), welche durch ITC hochreguliert werden können (*Keck and Finley*, 2004). Jedoch hat sich gezeigt, dass nicht nur eine ITC-Steigerung das Ziel einer Se-Anreicherung zur Stimulierung gesundheitsfördernder Mechanismen sein soll. Denn eine Se-Düngung stimuliert die Synthese Se-haltiger Metabolite, welche anders als ihre S-

Vertreter deutlich aktiver sind (*Emmert et al.*, 2010; *Sharma et al.*, 2009). Nach derzeitiger Literatur liegt Se in Brassica bevorzugt als SeMeth-SeCys, welches die effektivste Form der Chemoprävention ist (*Marschner*, 1995, S. 526), während sein S-Vertreter SMeth-Scys 650fach weniger effektiv ist (*Ip and Ganther*, 1992). Aus SeMeth-SeCys wird Methylselenol synthetisiert, welches ein weiteres sehr potentiell Antikarzinogen darstellt (*Rayman*, 2008). Durch Se wird auch vermehrt GPx metabolisiert und somit die krebspräventive Wirkung erhöht.

Basierend auf dem im Experiment detektierten GLS- und GLS-HP-Gehalt soll nun geklärt werden, wie hoch die durch den Verzehr von Pak Choi gesundheitsfördernden Mengen sind. Für diese Kalkulation wurden die Pak Choi-Pflanzen herangezogen, welche unter den infolge der Ergebnisauswertung empfohlenen Düngungsbedingungen angezogen wurden (mit 300 mg S/Gefäß und 0,75 g N/Gefäß). Bei einem durchschnittlichen FM/TM-Verhältnis von 10 und einem GLS- und GLS-HP-Gehalt von 7,05 µmol GLS/g TM und 1,22 µmol GLS-HP/g FM würde der Verzehr von 200 g frischem Pak Choi eine Aufnahme von 141,0 µmol GLS und 244,0 µmol GLS-HP bedeuten. Basierend auf die im zweiten Versuchsteil mit Se-applizierten Pak Choi-Pflanzen, wurden diejenigen ausgewählt, welche den höchsten GLS-HP-Gehalt aufwiesen (Tab. 9-16). Basierend auf einem Se-Gehalt von 25,8 mg Se/kg TM (Se3) und dem durchschnittlichem FM/TM-Verhältnis, enthält eine komplette Pak Choi Pflanze bereits 1,81 mg Se ($25,8 \text{ mg Se/kg TM} = 2,6 \text{ mg Se/kg FM} = 1,81 \text{ mg Se/700 g FM}$). Somit würden bereits 70 g Pak Choi ausreichen, um die krebsrisikosenkende Se-Zufuhrempfehlung von 100–200 µg Se/d zu erreichen (*Ip and Ganther*, 1992). Bei einem höheren Pak Choi-Verzehr von beispielsweise 500 g würde eine Se-Blattapplikation von 0,5 mg mehr als ausreichend sein (468 µg Se/500 g FM; Tab. 9-14) und noch kein Toxizitätsrisiko eingehen (*Cakır et al.*, 2012, S. 217).

6 FAZIT

Glucosinolate (GLS) sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (SPI), überwiegend in *Brassica* vertreten und in in aliphatisch, aromatisch und indolisch klassifiziert. Durch Zellruption treten GLS mit dem Enzym Myrosinase (EC 3.2.1.147) in Kontakt und hydrolysieren zu bioaktiven Hydrolyseprodukte (u.a. Isothiocyanate (ITC), Nitrile und Epithionitrile). Insbesondere ITC werden krebspräventive Wirkungen zugesprochen (*Holst and Williamson, 2004*). Der Versuch zeigt, dass eine S-reiche Düngung nicht nur zu einer gesteigerten GLS- und GLS-HP-Konzentration, sondern auch einer optimierten Musterverteilung zu vermehrt aliphatischen GLS und ITC führt. Letzteres ist aus krebspräventiver Sicht wünschenswert. Zudem wurde ein beachtlicher Anteil Epithionitrile synthetisiert, deren chemopräventive Wirkung weiterer Forschung bedarf. Eine Düngung von 1,5 g N/Gefäß führte teilweise zu einer Reduktion der SPI mit verstärkter Synthese indolischer GLS und Nitrile. Dies resultiert nicht nur in einer Qualitätsreduktion, sondern auch zu teils kanzerogenen Wirkungen. Das ITC/Nitril-Verhältnis stellt hier einen idealen Parameter für künftige Ernährungsempfehlungen dar. Letztendlich ist bei der Anzucht von Pak Choi stets auf eine erhöhte S- (300 mg/Gefäß) und eine moderate N-Düngung (0,75 g/Gefäß) zu achten, um eine optimierte Konzentration der GLS und GLS-HP mit Folge einer gesundheitsfördernden Wirkung zu erzielen.

Se übernimmt als Bestandteil wichtiger Enzyme (z.B. GSH, GPx), sowie Eingriff in die Phasen der Karzinomentstehung eine wichtige Rolle in der Chemoprävention. Da sowohl der S- als auch der Se-Stoffwechsel und deren Metabolitsynthese stark aneinander gekoppelt sind, können diese miteinander konkurrieren. Das Experiment veranschaulicht, dass eine Se-Blattapplikation auf Pak Choi entgegen einiger Veröffentlichungen zu keiner GLS-Reduktion aber auch keiner Konzentrationssteigerung führte. Hingegen konnte der Anteil der GLS-HP mit 2 mg Se/Pflanze erhöht werden. Dies ist äußerst vielversprechend, da Se-haltige GLS-HP intensivere krebspräventive Mechanismen auslösen als deren S-haltigen Vertreter (*Emmert et al., 2010; Sharma et al., 2009*). Doch nicht nur aufgrund dessen kann eine gleichzeitige S-Düngung und Se-Blattapplikation sinnvoll sein, um den krebspräventive Eigenschaften sowohl S- als auch Se-haltiger Enzyme und GLS-HP optimieren zu können. Pflanzliche Lebensmittel können zudem infolge einer Se-Blattapplikation die deutlich unzureichende Se-Zufuhr der deutschen und insbesondere der vegetarisch ernährenden Bevölkerung optimieren (*Fiedler and Rösler, 1993, S. 302*).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Aus Sicht der Krankheitsprävention ist eine Anreicherung gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe in Kulturpflanzen hilfreich, um deren Bioverfügbarkeit im Humanstoffwechsel zu erhöhen. Diese Anreicherung kann u.a. durch Düngungsmaßnahmen geschehen. Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe Glucosinolate (GLS) und deren Hydrolyseprodukte (GLS-HP) (z.B. Isothiocyanate (ITC) und Nitrile) sind insbesondere für ihre gesundheitsfördernde Wirkung bekannt und primär in *Brassica*-Arten vertreten.

Da GLS sowie GLS-HP Stickstoff (N)- und teils Schwefel (S)-haltig sind, können sowohl die Konzentration als auch das Muster dieser Metabolite durch eine N-S-Düngung gezielt gesteuert werden. Die gesundheitsfördernde Wirkung der GLS-HP (insbesondere der ITC) erfolgt durch Induktion der Genexpression antioxidativer Enzyme und kann durch eine Metabolitanreicherung infolgedessen optimiert werden. In einem Gefäßversuch mit Pak Choi (*Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi*) wurde eine stufenweise gesteigerte S- (0, 60 und 300 mg S/Gefäß) und N-Düngung (0,75 und 1,5 g N/Gefäß) appliziert. Analysiert wurden FM und TM, N und S mittels Elementaranalyse, Sulfat und Nitrat mittels IC, GLS mittels HPLC und GLS-HP mittels GC-MS. Eine S-reiche Düngung resultierte in einer gesteigerten Konzentration und einem optimierten Muster mit vermehrt aliphatischen GLS und ITC, welches aus krebspräventiver Sicht wünschenswert ist. Hingegen führte eine N-reiche Düngung abschnittsweise zu einer Reduktion der GLS und GLS-HP mit einer verstärkten Synthese indolischer GLS und Nitrile. Demnach ist ein hohes ITC/Nitril-Verhältnis erstrebenswert. Letztendlich wird speziell für die Anzucht von Pak Choi eine hohe S- (300 mg/Gefäß) und moderate N-Düngung (0,75 g/Gefäß) empfohlen, um eine optimale GLS-Verteilung und die gesundheitsfördernde Wirkung zu erzielen.

Selen (se) wirkt an sich bereits antioxidativ und steht zur Diskussion in GLS inkorporiert zu werden. Problematischerweise stehen Se und S in Aufnahme- und Metabolismuskonkurrenz. In einem Hydrokulturversuch wurden verschiedene Se-Konzentrationen (0, 60, 300 mg Se/Pflanze) über das Blatt der *Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* appliziert. Neben den Parametern aus Versuch 1 wurde die Se-Konzentration mittels ICP-MS ermittelt. Entgegen einiger Veröffentlichungen bewirkte Se weder eine Steigerung noch eine Reduktion der GLS-Konzentration. Hingegen konnte der Anteil der GLS-HP mit 2 mg Se/Pflanze erhöht werden. Dies ist äußerst vielversprechend, da den Se-haltigen GLS-HP wirkungsvollere krankheitspräventive Mechanismen zugesprochen werden.

8 SUMMARY

For illness prevention an enrichment of health promoting ingredients is helpful to raise their bioavailability in the human metabolism. This enrichment can be initiated by fertilization. The secondary plant ingredients glucosinolates (GLS) and their hydrolysis products (GLS-HP) (e.g. isothiocyanates (ITC), nitriles) are known for their health supporting effect and are mainly represented in *Brassica*.

As GLS and GLS-HP are transient nitrogen (N) and partly sulfur (S) reservoirs, concentration as well as pattern can be regulated by N and S fertilization. The health supporting effect of GLS-HP (esp. ITC) occurs through induced expression of antioxidative enzymes and can be optimized by enrichment of these metabolites. In present study plants of *Brassica Rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* were fertilized with different S (0, 60, 300 mg pot⁻¹) and N concentrations (0.75, 1.5 g pot⁻¹). Following parameters were determined: FM and DM, N and S by elementary analysis, nitrate and sulfate by IC, GLS by HPLC and GLS-HP by GC-MS. A high S fertilization resulted in increased concentration and optimized pattern with higher aliphatic GLS and ITC amounts - A desirable fact from cancer preventive view. However, high N fertilization partly led to reduction of GLS and GLS-HP with increased synthesis of indolic GLS and nitriles. Therefore, a high ITC/Nitrile relation is worthwhile. In conclusion, especially for the cultivation of Pac Choi a high S (300 mg pot⁻¹) and a moderate N fertilization (0.75 g pot⁻¹) is recommended to achieve an optimized metabolite distribution and its resulting health promoting effect.

Selenium (se) has antioxidative effects and is under consideration to be incorporated into GLS. Nevertheless, S and Se compete for uptake and metabolism in the plant. In a hydroponic experiment varied Se concentration (0, 60, 300 mg Se plant⁻¹) was applied to *Brassica rapa* L. var. *chinensis* cv. *Joi Choi* by leaf application. Additionally to the parameters of the first experiment Se concentrations were determined by ICP-MS. Contrary to some publications the GLS concentration remained unaffected by Se application. However, a higher concentration of the GLS-HP could be determined under 2 mg of Se plant⁻¹. This fact is extremely promising, due to the consideration of Se containing GLS-HP being more effective in illness prevention than S containing GLS-HP.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J.H., Jander, G. (2009): Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews* 8, 101–120.
- Agerbirk, N., Olsen, C.E., Sørensen, H. (1998): Initial and Final Products, Nitriles, and Ascorbigens Produced in Myrosinase-Catalyzed Hydrolysis of Indole Glucosinolates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1563–1571.
- Ahmad, A., Abraham, G., Abdin, M.Z. (1999): Physiological Investigation of the Impact of Nitrogen and Sulphur Application on Seed and Oil Yield of Rapeseed (*Brassica campestris* L.) and Mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.) Genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183, 19–25.
- Ahmad, G., Jan, A., Arif, M., Jan, M.T., Khattak, R.A. (2007): Influence of nitrogen and sulfur fertilization on quality of canola (*Brassica napus* L.) under rainfed conditions. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 8, 731–737.
- Amberger, A. (1996): Pflanzenernährung, 4. Auflage. ed. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Ambrosone, C.B., McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Zhang, Y., Shields, P.G. (2004): Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J. Nutr.* 134, 1134–1138.
- Anderson, J.W., McMahon, P.J. (2001): The Role of Glutathione in the Uptake and Metabolism of Sulfur and Selenium, in: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (eds.): Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 57–99.
- Andréasson, E., Jørgensen, L.B., Höglund, A.-S., Rask, L., Meijer, J. (2001): Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 127, 1750–1763.
- Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., Brigelius-Flohé, R. (2005): The GI-GPx Gene Is a Target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4914–4923.
- Barickman, T.C., Kopsell, D.A., Sams, C.E. (2013): Selenium Influences Glucosinolate and Isothiocyanates and Increases Sulfur Uptake in *Arabidopsis thaliana* and Rapid-Cycling *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 202–209.
- Barker, A.V., Bryson, G.M. (2007): Nitrogen, in: Barker, A.V., Pilbeam, D.J. (eds.): Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 21–50.
- Bartel, B., Fink, G.R. (1994): Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6649–6653.
- Basten, G.P., Bao, Y., Williamson, G. (2002): Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis* 23, 1399–1404.

- Bertelsen, F., Gissel-Nielsen, G., Kiær, A., Skrydstrup, T. (1988): Selenoglucosinolates in nature: Fact or myth? *Phytochemistry* 27, 3743–3749.
- Bilsborrow, P.E., Evans, E.J., Zhao, F.J. (1993): The influence of spring nitrogen on yield, yield components and glucosinolate content of autumn-sown oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of agricultural science* 120, 219–219.
- Bloem, E., Haneklaus, S., Peplow, E., Sator, C., Köhler, T., Schnug, E. (2001): The effect of sulphur and nitrogen fertilisation on the glucotropaeolin content in *Tropaeolum majus* (L.), Freising-Weißenstephan: 185–190.
- Bloem, E., Haneklaus, S., Schnug, E. (2007): Comparative effects of sulfur and nitrogen fertilization and post-harvest processing parameters on the glucotropaeolin content of *Tropaeolum majus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1576–1585.
- Bones, A.M., Rossiter, J.T. (2006): The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67, 1053–1067.
- Bones, A.M., Visvalingam, S., Thangstad, O.P. (1994): Sulphate can induce differential expression of thioglucoside glucosylhydrolases (myrosinases). *Planta* 193, 558–566.
- Booth, E.J., Walker, K.C., Griffiths, D.W. (1990): Effect of harvest date and pod position on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53, 43–61.
- Bosma, W., Schupp, R., De Kok, L.J., Rennenberg, H. (1991): Effect of selenate on assimilatory sulfate reduction and thiol content of spruce needles [cysteine synthase, gamma-glutamyl-cysteine, sulphhydryl compounds, APS sulfotransferase]. *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.
- Bretz, F., Hothorn, T., Westfall, P. (2010): Multiple Comparisons Using R. CRC Press.
- Brown, P.D., Morra, M.J. (1995): Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.* 43, 3070–3074.
- Brunold, C. (1990): Regulatory interactions between sulfate and nitrate assimilation, in: De Kok, L.J., Stulen, I., Rennenberg, H., Rauser, W. (eds.): Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. Fundamental Environmental and Agricultural Aspects. SPB Academic Publishing, The Hague, S. 125–138.
- Brunold, C., Suter, M. (1984): Regulation of Sulfate Assimilation by Nitrogen Nutrition in the Duckweed *Lemna minor* L. *Plant Physiol* 76, 579–583.
- Burk, R.F. (1991): Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.* 5, 2274–2279.
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., Henrissat, B. (2000): High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J. Biol. Chem.* 275, 39385–39393.
- Cakır, Ö., Turgut-Kara, N., Ari, S. (2012): Selenium Metabolism in Plants: Molecular Approaches, in: Montanaro, G. (ed.): Advances in Selected Plant Physiology Aspects. InTech.

- Carpenter, C.L., Yu, M.C., London, S.J. (2009): Dietary Isothiocyanates, Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1), and Lung Cancer Risk in African Americans and Caucasians from Los Angeles County, California. *Nutr Cancer* 61, 492–499.
- Carroll, R.J., Ruppert, D. (1988): Transformation and Weighting in Regression. CRC Press.
- Charron, C.S., Kopsell, D.A., Randle, W.M., Sams, C.E. (2001): Sodium selenate fertilisation increases selenium accumulation and decreases glucosinolate concentration in rapid-cycling Brassica oleracea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 962–966.
- Chen, S., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Schulz, A., Halkier, B.A. (2001): Long-Distance Phloem Transport of Glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127, 194–201.
- Chen, X., Zhu, Z., Ni, X., Qian, Q. (2006): Effect of Nitrogen and Sulfur Supply on Glucosinolates in Brassica campestris ssp. chinensis. *Agricultural Sciences in China* 5, 603–608.
- Chung, F.L., Conaway, C.C., Rao, C.V., Reddy, B.S. (2000): Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 21, 2287–2291.
- Ciska, E., Martyniak-Przybyszewska, B., Kozłowska, H. (2000): Content of Glucosinolates in Cruciferous Vegetables Grown at the Same Site for Two Years under Different Climatic Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2862–2867.
- Cole, R.A. (1980): Volatile components produced during ontogeny of some cultivated crucifers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31, 549–557.
- Combs, G.F. (2001): Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition* 85, 517–547.
- Combs Jr., G.F., Gray, W.P. (1998): Chemopreventive Agents: Selenium. *Pharmacology & Therapeutics* 79, 179–192.
- Cornblatt, B.S., Ye, L., Dinkova-Kostova, A.T., Erb, M., Fahey, J.W., Singh, N.K., Chen, M.-S.A., Stierer, T., Garrett-Mayer, E., Argani, P., Davidson, N.E., Talalay, P., Kensler, T.W., Visvanathan, K. (2007): Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* 28, 1485–1490.
- De Souza, M.P., Pickering, I.J., Walla, M. (2002): Selenium assimilation and volatilization from selenocyanate-treated Indian mustard and muskgrass. *Plant Physiol.* 128, 625–633.
- Deutsches Institut für Normung (1995): Bestimmung des Glucosinolatgehaltes Teil 1: HPLC-Verfahren (ISO 9167-1:1992) 1–8.
- Deutsches Institut für Normung (2005): DIN EN ISO 17294-2 Wasserbeschaffenheit - Anwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) - Teil 2: Bestimmung von 62 Elementen 1–33.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002): Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *PNAS* 99, 11908–11913.

- Du, L., Halkier, B.A. (1998): Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*. *Phytochemistry* 48, 1145–1150.
- Ellis, D.R., Salt, D.E. (2003): Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 273–279.
- Emmert, S.W., Desai, D., Amin, S., Richie, J.P. (2010): Enhanced Nrf2-dependent induction of glutathione in mouse embryonic fibroblasts by isoselenocyanate analog of sulforaphane. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 2675–2679.
- Ernst, I.M.A., Wagner, A.E., Schuemann, C., Storm, N., Höppner, W., Döring, F., Stocker, A., Rimbach, G. (2011): Allyl-, butyl- and phenylethyl-isothiocyanate activate Nrf2 in cultured fibroblasts. *Pharmacological Research* 63, 233–240.
- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Suzuki, T., Morino, Y., Soda, K. (1981): Enzymatic synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry* 20, 4492–4496.
- Ettlinger, M.G. (1950): Synthesis of the Natural Antithyroid Factor 1-5-Vinyl-2-thioöxazolidone. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4792–4796.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P. (2001): The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5–51.
- Falk, K.L., Tokuhisa, J.G., Gershenzon, J. (2007): The Effect of Sulfur Nutrition on Plant Glucosinolate Content: Physiology and Molecular Mechanisms. *Plant Biology* 9, 573–581.
- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Gmelin, R., Rakow, D., Thies, W. (1981): Glucosinabin in *Brassica napus* - a re-evaluation. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 87, 254–259.
- Fiedler, H.J., Rösler, H.J. (1993): Spurenelemente in der Umwelt, 2. Auflage. ed. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Finley, J.W., Sigrid-Keck, A., Robbins, R.J., Hintze, K.J. (2005): Selenium Enrichment of Broccoli: Interactions between Selenium and Secondary Plant Compounds. *J. Nutr.* 135, 1236–1238.
- Fischer, J. (1992): The influence of different nitrogen and potassium fertilisation on the chemical flavour composition of kohlrabi (*Brassica oleracea* var *gongylodes* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 465–470.
- Fuchs, G., Schlegel, H.G. (2007): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag.
- Gadamer, J. (1897a): Ueber das Sinigrin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 30, 2322–2327.
- Gadamer, J. (1897b): Über die Bestandteile des schwarzen und des weissen Senfsamens. *Archiv der Pharmazie* 235, 44–114.
- Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.-A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., Tercé, F. (2000): Sulforaphane, a Naturally Occurring Isothiocyanate, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res* 60, 1426–1433.

- Gerendás, J., Breuning, S., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., Mühling, K.H. (2008a): Isothiocyanate Concentration in Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) Plants As Influenced by Sulfur and Nitrogen Supply. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8334–8342.
- Gerendás, J., PodestÁt, J., Stahl, T., Kübler, K., Brückner, H., Mersch-Sundermann, V., Mühling, K.H. (2009): Interactive Effects of Sulfur and Nitrogen Supply on the Concentration of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 57, 3837–3844.
- Gerendás, J., Sailer, M., Fendrich, M.-L., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., Mühling, K.H. (2008b): Influence of sulfur and nitrogen supply on growth, nutrient status and concentration of benzyl-isothiocyanate in cress (*Lepidium sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2576–2580.
- Germ, M., Stibilj, V., Osvald, J., Kreft, I. (2007): Effect of Selenium Foliar Application on Chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55, 795–798.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (2003): A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 1403–1409.
- Gronowitz, S., Svensson, L., Ohlson, R. (1978): Studies of some nonenzymic reactions of progoitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 887–890.
- Grubb, C.D., Abel, S. (2006): Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11, 89–100.
- Haack, M., Löwinger, M., Lippmann, D., Kipp, A., Pagnotta, E., Iori, R., Monien, B.H., Glatt, H., Brauer, M.N., Wessjohann, L.A., Brigelius-Flohé, R. (2010): Breakdown products of neoglucobrassicin inhibit activation of Nrf2 target genes mediated by myrosinase-derived glucoraphanin hydrolysis products. *Biological Chemistry* 391, 1281–1293.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. (2006): Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57, 303–333.
- Haneklaus, S., Bloem, E., Schnug, E., De Kok, L.J., Stulen, I. (2007): Sulfur, in: Barker, A.V., Pilbeam, D.J. (eds.): *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 183–223.
- Hansson, L.E., Nyrén, O., Bergström, R., Wolk, A., Lindgren, A., Baron, J., Adami, H.O. (1993): Diet and risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *Int. J. Cancer* 55, 181–189.
- Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H. (2005): *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik ; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*. Oldenbourg Verlag.
- Hawkesford, M.J. (2000): Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *J. Exp. Bot.* 51, 131–138.
- Heldt, H.-W., Piechulla, B. (2008): *Pflanzenbiochemie*, 4. Auflage. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Herrmann, K. (2001): *Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse: 50 Tabellen und Übersichten*. Ulmer Eugen Verlag.

- Hirschi, K.D. (2009): Nutrient Biofortification of Food Crops. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 401–421.
- Holst, B., Williamson, G. (2004): A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 21, 425–447.
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S., Lindenmeier, G., Helferich, S., Hopf, I., Hunsicker, A. (2005): Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium, Auflage: 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart u.a.
- Hsu, F.-C., Wirtz, M., Heppel, S.C., Bogs, J., Krämer, U., Khan, M.S., Bub, A., Hell, R., Rausch, T. (2011): Generation of Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on S metabolism. *Plant, Cell & Environment* 34, 192–207.
- Hu, K., Zhu, Z., Zang, Y., Hussain, S.A. (2011): Accumulation of glucosinolates and nutrients in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) two cultivar plants exposed to sulfur deficiency. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 52, 121–127.
- Huysen, T.V., Abdel-Ghany, S., Hale, K.L., LeDuc, D., Terry, N., Pilon-Smits, E.A.H. (2003): Overexpression of cystathionine- γ -synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* 218, 71–78.
- Ip, C., Ganther, H.E. (1992): Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis* 13, 1167–1170.
- Ježek, P., Hlušek, J., Lošák, T., Jůzl, M., Elzner, P., Kráčmar, S., Buňka, F., Martensson, A. (2011): Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant, soil and environment* 57, 315–320.
- Kallabis-Rippel, K. (2000): Untersuchungen zu Pak Choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt): Anbau und Genußeigenschaften. Herbert Utz Verlag, München.
- Kápolna, E., Laursen, K.H., Husted, S., Larsen, E.H. (2012): Bio-fortification and isotopic labelling of Se metabolites in onions and carrots following foliar application of Se and ⁷⁷Se. *Food Chemistry* 133, 650–657.
- Kasper, H. (2004): Ernährungsmedizin und Diätetik. Elsevier, Urban & Fischer.
- Keck, A.-S., Finley, J.W. (2004): Cruciferous Vegetables: Cancer Protective Mechanisms of Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium. *Integr Cancer Ther* 3, 5–12.
- Kelly, P.J., Bones, A., Rossiter, J.T. (1998): Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta* 206, 370–377.
- Kim, J.K., Chu, S.M., Kim, S.J., Lee, D.J., Lee, S.Y., Lim, S.H., Ha, S.-H., Kweon, S.J., Cho, H.S. (2010): Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food Chemistry* 119, 423–428.
- Kim, S.-J., Matsuo, T., Watanabe, M., Watanabe, Y. (2002): Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 48, 43–49.
- Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., Hayes, R.B. (2007): Prospective Study of Fruit and Vegetable Intake and Risk of Prostate Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 99, 1200–1209.

- Kissen, R., Rossiter, J.T., Bones, A.M. (2009): The “mustard oil bomb”: not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochem Rev* 8, 69–86.
- Kjaer, A., Schuster, A. (1972): Glucosinolates in seeds of *Arabis hirsuta* (L.) Scop.: some new, naturally derived isothiocyanates. *Acta Chem. Scand* 26.
- Kjær, A., Skrydstrup, T. (1987): Selenoglucosinolates: Synthesis and Enzymatic Hydrolysis. *Acta Chemica Scandinavica* 29–33.
- Kopsell, D.A., Sams, C.E., Barickman, T.C., Deyton, D.E., Kopsell, D.E. (2009): Selenization of Basil and Cilantro Through Foliar Applications of Selenate-selenium and Selenite-selenium. *HortScience* 44, 438–442.
- Kopsell, D.E., Kopsell, D.A. (2007): Selenium, in: Barker, A.V., Pilbeam, D.J. (eds.): Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, S. 515–549.
- Koricheva, J. (1999): Interpreting phenotypic variation in plant allelochemistry: problems with the use of concentrations. *Oecologia* 119, 467–473.
- Kutz, A., Müller, A., Hennig, P., Kaiser, W.M., Piotrowski, M., Weiler, E.W. (2002): A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30, 95–106.
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D.J., Gershenzon, J. (2001): The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* 13, 2793–2807.
- Lanzani, A., Petrini, M.C., Jacini, G. (1976): Progoitrin transformation products. I. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 53, 105–107.
- Larsen, E.H., Andersen, N.L., Møller, A., Petersen, A., Mortensen, G.K., Petersen, J. (2002): Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Addit Contam* 19, 33–46.
- Li, S., Schonhof, I., Krumbein, A., Li, L., Stützel, H., Schreiner, M. (2007): Glucosinolate Concentration in Turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.) Roots as Affected by Nitrogen and Sulfur Supply. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8452–8457.
- Lin, H.J., Probst-Hensch, N.M., Louie, A.D., Kau, I.H., Witte, J.S., Ingles, S.A., Frankl, H.D., Lee, E.R., Haile, R.W. (1998): Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 647–652.
- Lippmann, D., Lehmann, C., Florian, S., Barknowitz, G., Haack, M., Mewis, I., Wiesner, M., Schreiner, M., Glatt, H.-R., Brigelius-Flohe, R., Kipp, A.P. (2014): Glucosinolates from pak choi and broccoli induce enzymes and inhibit inflammation and colon cancer differently. *Food Funct.* accepted manuscript
- Lüthy, B., Matile, P. (1984): The mustard oil bomb: Rectified analysis of the subcellular organisation of the myrosinase system. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 179, 5–12.

- Lykkesfeldt, J., Moller, B.L. (1993): Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. (Isothiocyanates as Potent Enzyme Inhibitors). *Plant Physiol* 102, 609–613.
- Lyons, G.H., Genc, Y., Soole, K., Stangoulis, J.C.R., Liu, F., Graham, R.D. (2009): Selenium increases seed production in Brassica. *Plant and soil* 318, 73–80.
- MacLeod, A.J., Panesar, S.S., Gil, V. (1981): Thermal degradation of glucosinolates. *Phytochemistry* 20, 977–980.
- Mari, M., Leoni, O., Iori, R., Cembali, T. (2002): Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology* 51, 231–236.
- Marschner, H. (1995): Mineral Nutrition of Higher Plants, 2. Auflage. ed. Elsevier Science Ltd., London.
- Matich, A.J., McKenzie, M.J., Lill, R.E., Brummell, D.A., McGhie, T.K., Chen, R.K.-Y., Rowan, D.D. (2012): Selenoglucosinolates and their metabolites produced in Brassica spp. fertilised with sodium selenate. *Phytochemistry* 75, 140–152.
- McGregor, D.I. (1988): Glucosinolate content of developing rapeseed (*Brassica napus* L. “Midas”) seedlings. *Can. J. Plant Sci.* 68, 367–380.
- McIntyre, G.I. (1997): The Role of Nitrate in the Osmotic and Nutritional Control of Plant Development. *Functional Plant Biol.* 24, 103–118.
- Mithen, R., Clarke, J., C. Lister, Dean, C. (1995): Genetics of aliphatic glucosinolates. III. Side chain structure of aliphatic glucosinolates in. *Heredity* 74, 0–215.
- Mithen, R.F. (2001): Glucosinolates and their degradation products, in: Advances in Botanical Research. Academic Press, S. 213–262.
- Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., Johnson, I.T. (2000): The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 967–984.
- Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., Halkier, B.A. (2012): NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* advance online publication.
- Ohtsuru, M., Hata, T. (1979): The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* 567, 384–391.
- Omirou, M., Papastefanou, C., Katsarou, D., Papastylianou, I., Passam, H.C., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K.K. (2012): Relationships between nitrogen, dry matter accumulation and glucosinolates in *Eruca sativa* Mills. The applicability of the critical NO₃-N levels approach. *Plant Soil* 354, 347–358.
- Omirou, M.D., Papadopoulou, K.K., Papastylianou, I., Constantinou, M., Karpouzas, D.G., Asimakopoulos, I., Ehaliotis, C. (2009): Impact of Nitrogen and Sulfur Fertilization on the Composition of Glucosinolates in Relation to Sulfur Assimilation in Different Plant Organs of Broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9408–9417.

- Pedrero, Z., Madrid, Y.* (2009): Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. *Anal. Chim. Acta* 634, 135–152.
- Petersen, B., Chen, S., Hansen, C., Olsen, C., Halkier, B.* (2002): Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214, 562–571.
- Polatajko, A., Śliwka-Kaszyńska, M., Dernovics, M., Ruzik, R., Encinar, J.R., Szpunar, J.* (2004): A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 114–120.
- Preussmann, R.* (1993): Das Nitratproblem und die endogene Bildung cancerogener N-Nitrosoverbindungen, in: Zakosek, H., Lenz, F. (eds.): Nitrat in Boden und Pflanze unter besonderer Berücksichtigung des Gemüsebaus. E. Ulmer, Stuttgart (Hohenheim), S. 8–20.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J.* (2000): Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae, in: Plant Molecular Evolution. Springer, S. 93–113.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E.* (2000): Biologie der Pflanzen. Walter de Gruyter.
- Reinken, G.* (1992): Gemüse mit Nitrat - hemmt oder fördert es die Gesundheit? *Rheinische Monatszeitschrift für Gemüse, Obst, Zierpflanzen* 317.
- Richter, G.* (1998): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Georg Thieme Verlag.
- Ríos, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J.M.* (2009): Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154, 107–116.
- Robbins, R.J., Keck, A.-S., Banuelos, G., Finley, J.W.* (2005): Cultivation Conditions and Selenium Fertilization Alter the Phenolic Profile, Glucosinolate, and Sulforaphane Content of Broccoli. *Journal of Medicinal Food* 8, 204–214.
- Robiquet, P., Boutron-Charlard, A.F.* (1831): Nouvelles expériences sur la semence de moutarde. France.
- Rosen, C.J., Fritz, V.A., Gardner, G.M., Hecht, S.S., Carmella, S.G., Kenney, P.M.* (2005): Cabbage Yield and Glucosinolate Concentrations as Affected by Nitrogen and Sulfur Fertility. *HortScience* 40, 1493–1498.
- Sams, C.E., Panthee, D.R., Charron, C.S., Kopsell, D.A., Yuan, J.S.* (2011): Selenium Regulates Gene Expression for Glucosinolate and Carotenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 136, 23–34.
- Schaarschmidt, F., Vaas, L.* (2009): Analysis of Trials with Complex Treatment Structure Using Multiple Contrast Tests. *HortScience* 44, 188–195.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., Reymond, P.* (2008): The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant Journal* 55, 774–786.
- Schnug, E.* (1990): Sulphur nutrition and quality of vegetables. *Sulphur in Agriculture* 14, 3–7.

- Schnug, E., Haneklaus, S.* (1993): Regulation of glucosinolate biosynthesis in oilseed rape by nutritional factors., in: GCIRC-Bulletin N°10. Deutschland, S. 72–78.
- Schnug, E., Haneklaus, S., Borchers, A., Polle, A.* (1995): Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158, 67–69.
- Selenka, F., Brand-Grimm, D.* (1976): Nitrate and nitrite in human food calculation of the daily intake and its range. *Zentralbl Bakteriolog Orig B* 162, 449–466.
- Seppänen, M.M., Kontturi, J., Heras, I.L., Madrid, Y., Cámara, C., Hartikainen, H.* (2010): Agronomic biofortification of Brassica with selenium—enrichment of SeMet and its identification in Brassica seeds and meal. *Plant Soil* 337, 273–283.
- Sharma, A., Sharma, A.K., Madhunapantula, S.V., Desai, D., Huh, S.J., Mosca, P., Amin, S., Robertson, G.P.* (2009): Targeting Akt3 signaling in malignant melanoma using isoselenocyanates. *Clin. Cancer Res.* 15, 1674–1685.
- Shattuck, V.I., Wang, W.* (1994): Growth stress induces glucosinolate changes in pakchoy (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *Canadian Journal of Plant Science* 74, 595–601.
- Smith, F.W., Loneragan, J.F.* (1997): Interpretation of plant analysis: concepts and principles, in: *Plant Analysis: An Interpretation Manual*. CSIRO Publishing, S. 3–33.
- Smith, T.K., Lund, E.K., Johnson, I.T.* (1998): Inhibition of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and induction of apoptosis in rat colon following oral administration of the glucosinolate sinigrin. *Carcinogenesis* 19, 267–273.
- Sønderby, I.E., Geu-Flores, F., Halkier, B.A.* (2010): Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 15, 283–290.
- Spitz, M.R., Duphorne, C.M., Detry, M.A., Pillow, P.C., Amos, C.I., Lei, L., de Andrade, M., Gu, X., Hong, W.K., Wu, X.* (2000): Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 1017–1020.
- Sugihara, S., KONDO, M., Chihara, Y., Y&Uc;JI, M., Hattori, H., Yoshida, M.* (2004): Preparation of Selenium-enriched Sprouts and Identification of Their Selenium Species by High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 193–199.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R.* (2011): Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annual Review of Plant Biology* 62, 157–184.
- Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S.* (2000): Selenium in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 401–432.
- Theml, H.* (2005): *Krebs und Krebsvermeidung*. C.H. Beck Verlag.
- Thornalley, P.J.* (2002): Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. *Anticancer Drugs* 13, 331–338.

- Toler, H.D., Charron, C.S., Sams, C.E., Randle, W.R. (2007): Selenium Increases Sulfur Uptake and Regulates Glucosinolate Metabolism in Rapid-cycling Brassica oleracea. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132, 14–19.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A., Benavente-García, A.G., García-Viguera, C. (2003): Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *J. Sci. Food Agric.* 83, 307–313.
- VanEtten, C.H., Daxenbichler, M.E., Peters, J.E., Tookey, H.L. (1966): Variation in Enzymatic Degradation Products from Major Thioglucosides in Crambe abyssinica and Brassica napus Seed Meals. *J. Agric. Food Chem.* 14, 426–430.
- Venter, F. (1984): Nitrat im Gemüse. *Gartenbaureport* 2–7.
- Vos, M. de, Kriksunov, K.L., Jander, G. (2008): Indole-3-Acetonitrile Production from Indole Glucosinolates Deters Oviposition by Pieris rapae. *Plant Physiol.* 146, 916–926.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Talalay, P. (2004): Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2040–2045.
- Wakhloo, J.L., Staudt, A. (1988): Development of Nitrate Reductase Activity in Expanding Leaves of Nicotiana tabacum in Relation to the Concentration of Nitrate and Potassium. *Plant Physiol.* 87, 258–263.
- Wielanek, M., Bergier, K., Andrzejewska, R., Sklodowska, M. (2005): Incorporation of inorganic selenium into selenoglucosinolates in hairy root cultures of Nasturtium officinale R. Br. *R.Br. Biol. Lett.* 222–223.
- Wiesner, M., Zrenner, R., Krumbein, A., Glatt, H., Schreiner, M. (2013): Genotypic Variation of the Glucosinolate Profile in Pak Choi (Brassica rapa ssp. chinensis). *J. Agric. Food Chem.* 61, 1943–1953.
- Wittstock, U., Halkier, B.A. (2002): Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 7, 263–270.
- Wollny, P. (1887): Das Grundgesetz der Pflanzenproduktion 232–237, 257–260, 290–293.
- Wrigley, C., Cros, D., Archer, M., Downie, P., Roxburgh, C. (1980): The Sulfur Content of Wheat Endosperm Proteins and Its Relevance to Grain Quality. *Functional Plant Biol.* 7, 755–766.
- Ximénez-Embún, P., Alonso, I., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C. (2004): Establishment of Selenium Uptake and Species Distribution in Lupine, Indian Mustard, and Sunflower Plants. *J. Agric. Food Chem.* 52, 832–838.
- Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V. (2001): Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil* 237, 55–61.
- Yang, G.Q., Wang, S.Z., Zhou, R.H., Sun, S.Z. (1983): Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr* 37, 872–881.

-
- Ye, Z.H., Lin, Z.-Q., Whiting, S.N., De Souza, M.P., Terry, N. (2003): Possible use of constructed wetland to remove selenocyanate, arsenic, and boron from electric utility wastewater. *Chemosphere* 52, 1571–1579.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Saito, K., Takahashi, H. (2007): Posttranscriptional Regulation of High-Affinity Sulfate Transporters in Arabidopsis by Sulfur Nutrition. *Plant Physiol.* 145, 378–388.
- Zayed, A., Lytle, C.M., Terry, N. (1998): Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206, 284–292.
- Zayed, A.M., Terry, N. (1992): Selenium Volatilization in Broccoli as Influenced by Sulfate Supply. *Journal of Plant Physiology* 140, 646–652.
- Zhao, F., Evans, E.J., Bilsborrow, P.E., Syers, J.K. (1994): Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*brassica napus* l). *J. Sci. Food Agric.* 64, 295–304.
- Zhao, H., Lin, J., Grossman, H.B., Hernandez, L.M., Dinney, C.P., Wu, X. (2007): Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *Int. J. Cancer* 120, 2208–2213.

IV ANHANG

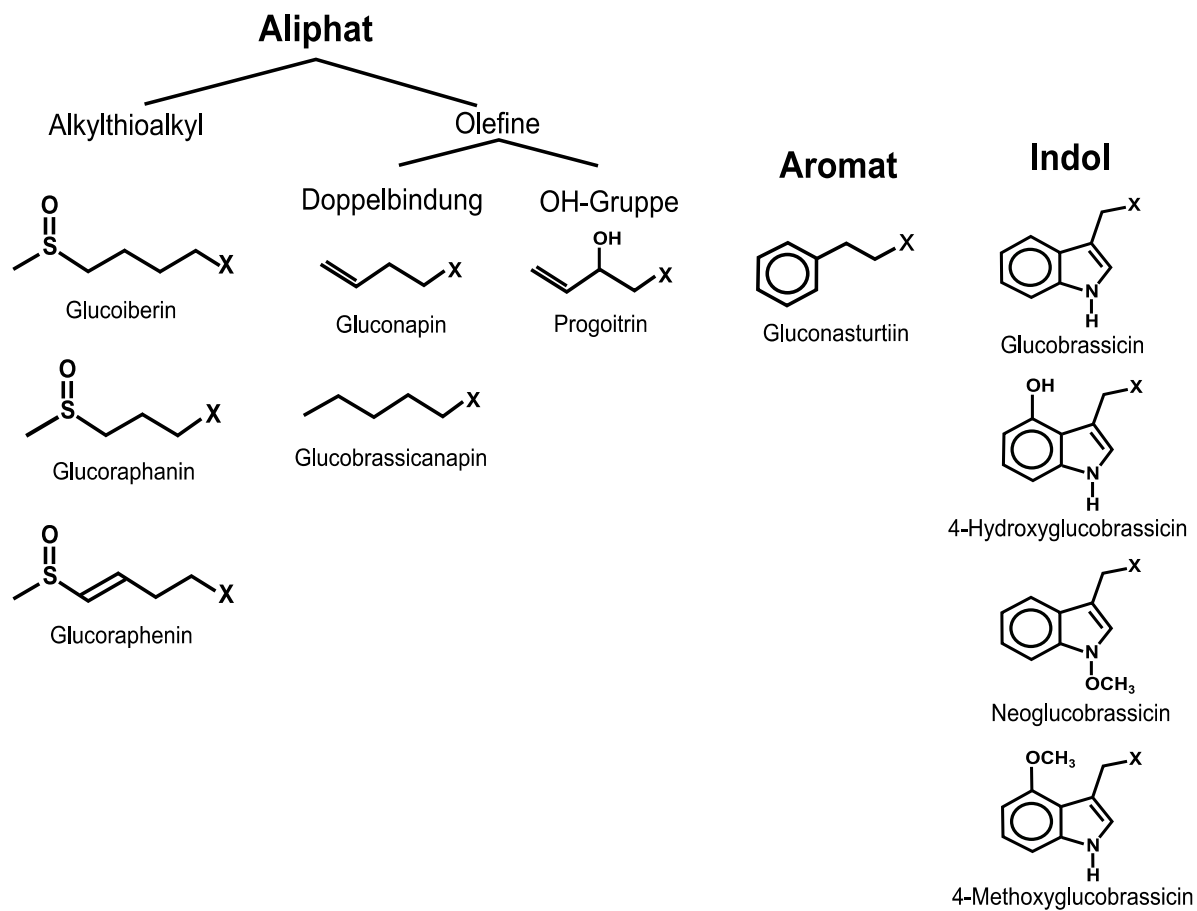


Abb. 9-1: Darstellung der chemischen Struktur der variablen Seitenkette von Glucosinolaten, klassifiziert in aliphatisch mit der Unterklasse der Alkylthioalkyle (S-haltig) und Olefine (mit Doppelbindung, mit OH-Gruppe), aromatisch und indolisch (modifiziert nach *Fahey et al.*, 2001).

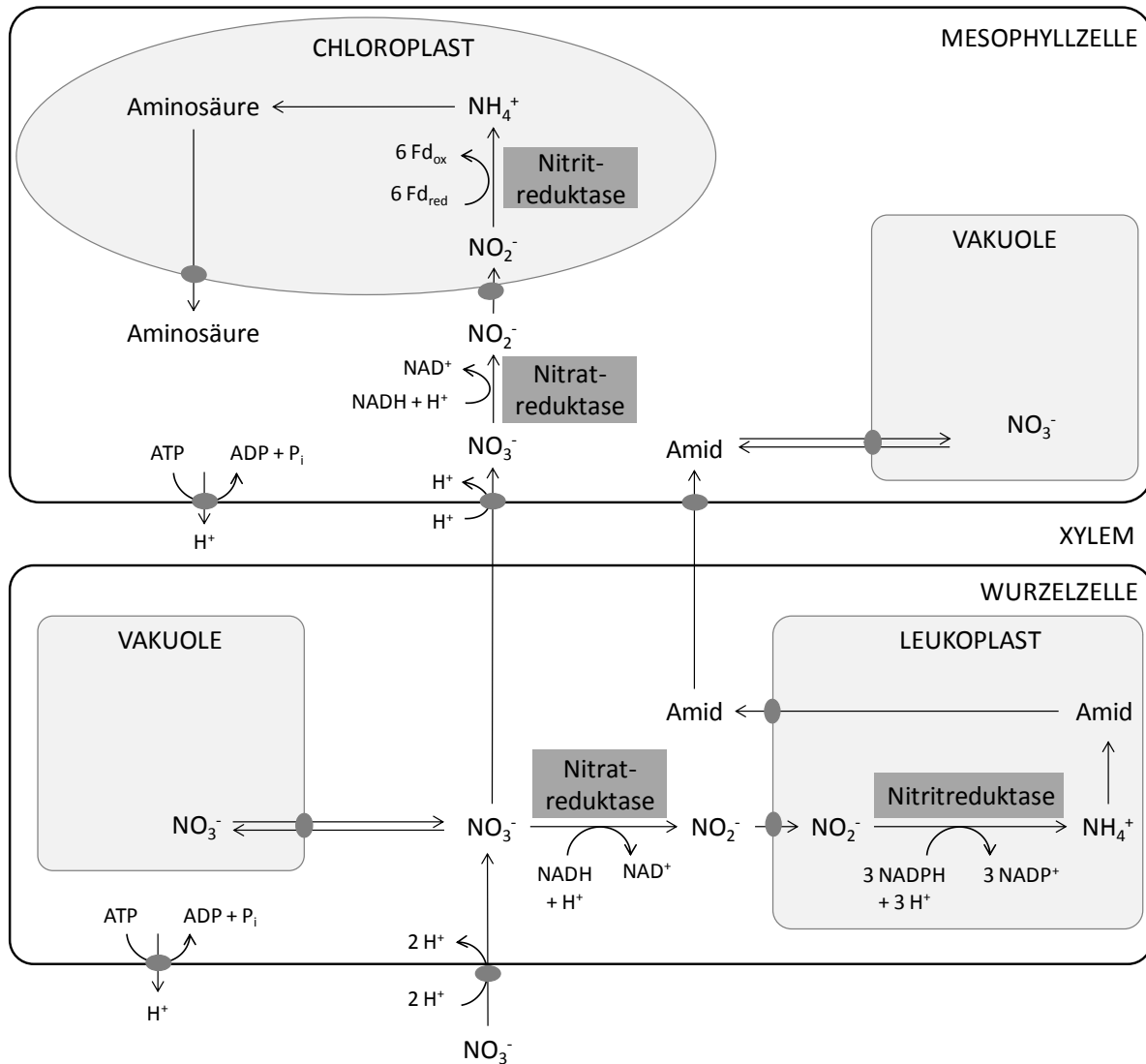
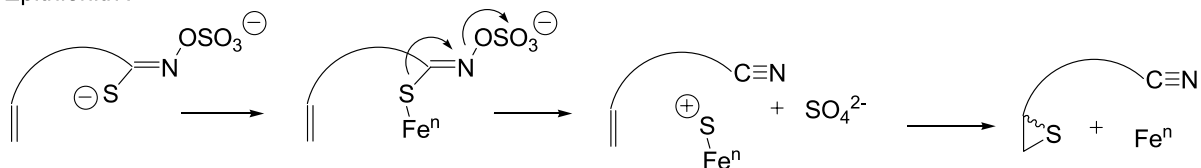


Abb. 9-2: Schematische Darstellung der Stickstoffaufnahme und -assimilation in der Pflanze. Nitrat wird im Symport in die Wurzelzelle aufgenommen, dort entweder in der Vakuole abgespeichert, enzymatisch im Leukoplasten zu Amide metabolisiert oder direkt über das Xylem ins Blatt transportiert. Dort wird es ebenfalls in der Vakuole gespeichert oder im Chloroplasten enzymatisch daraus AS synthetisiert, welche in den sekundären Metabolitsynthese einfließen. (eigene Darstellung modifiziert nach *Heldt and Piechulla, 2008*)

Epithionitril:



Nitril:

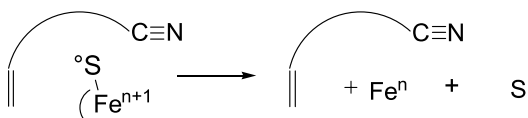


Abb. 9-3: Vermuteter Mechanismus der Epithionitril- und Nitril-Synthese mithilfe von Eisen (Fe^{2+}) und Epithiospezifischen Proteins (ESP) (modifiziert nach *Bones and Rossiter, 2006*).

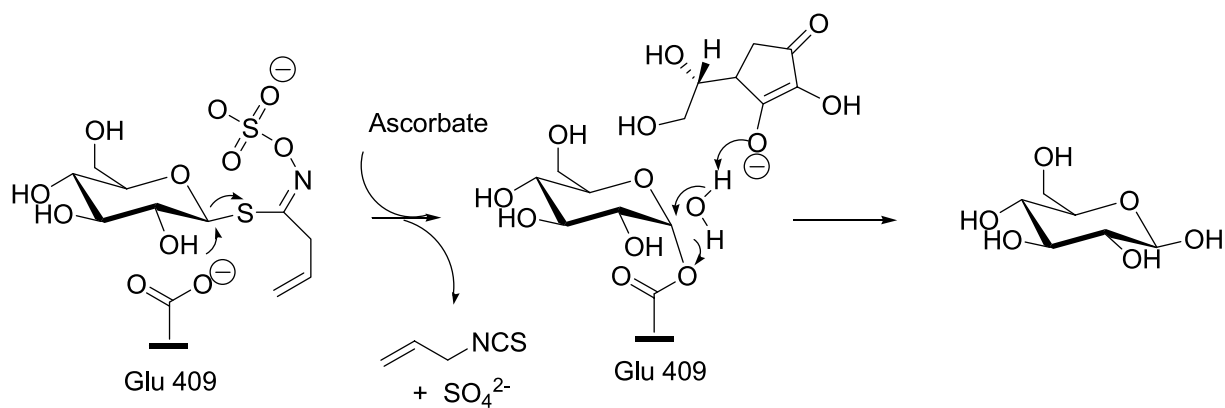


Abb. 9-4: Mechanismus der enzymatischen Glucose-Abspaltung mittels der Carboxylgruppe eines in Myrosinase enthaltenen Glutaminsäure-Restes (Glu 409) (modifiziert nach *Bones and Rossiter, 2006*).

Tab. 9-1: Retentionszeit (Rt) und Responsefaktor (Rf) der Glucosinolate in mit N- und S-gedüngten Pak Choi-Pflanzen.

GLS	Rt	Rf
Glucoiberin	4,5	1,07
Progoitrin	5,3	1,09
Sinigrin	6,0	1,00
Glucoraphanin	8,6	1,07
Gluconapin	10,3	1,11
4-Hydroxy-Glucobrassicin	13,2	0,28
Glucobrassicinapin	15,8	1,15
Glucobrassicin	20,0	0,29
Gluconasturtiin	22,9	0,95
Glucoraphenin	23,3	0,90
4-Methoxy-Glucobrassicin	24,8	0,25
Neoglucobrassicin	30,6	0,20

(modifiziert nach *Deutsches Institut für Normung*, 1995, S. 7)

Tab. 9-2: Versuchsplan der drei N und S-Versuche V1.1., V1.2. und V1.3.

V1. N und S-Versuch	V1.1.	V1.2.	V1.3.
Boden	“Ostenfeld“ Quarzsand „My Pool“ (2:1:1 Quarzsand 1.2 – 1.4 mm:Quarzsand 0.4 – 0.8 mm:Ostenfeld)	“Trappenkamp“ Quarzsand „My Pool“ (2:1:1 Quarzsand 1.2 – 1.4 mm:Quarzsand 0.4 – 0.8 mm:Trappenkamp)	“Trappenkamp“ Quarzsand „My Pool“ (2:1:1 Quarzsand 1.2 – 1.4 mm:Quarzsand 0.4 – 0.8 mm:Trappenkamp)
Anzahl Töpfe (biolog. Wdh)	30 (5)	24 (4)	24 (4)
N [g]	0,75 und 1,5	0,75 und 1,5	0,75 und 1,5
S [mg]	0, 60, 300 mg	0, 60, 300 mg	0, 60, 300 mg
Anziehen in Pikiergef. (Quarzsand)	30.11.2011	10.04.2012	10.04.2013
0,3%ige Previkurlösung	03.12.2011	10.04.2012	10.04.2013
Umtopfen in Mitscherlichgefäße	09.12.2011	20.04.2012	18.04.2013
Lichtzeit	8:00-16:00, ab 5.Tag 8:00 - 19:00	10:00 - 17:00, nach 7 Tagen 08:00- 19:00	12:00 - 17:00, nach 7 Tagen 08:00- 19:00
Luftfeuchtigkeit (LrF)	40%	40%	50%
Bewässerung	5 min/Tag (=60 ml dest/Tag), Erweiterung auf 2*15 min/Tag (=140 ml/tag)	2 * 3 min/Tag (=50 ml dest/Tag), Erweiterung auf 2*15 min/Tag (=120 ml/tag)	5 min/Tag (=60 ml dest/Tag), Erweiterung auf 2*15 min/Tag (=140 ml/tag)
Vereinzeln auf 1 Pflanze/Topf	02.01.2012	11.05.2012	29.04.2013
Problematik	12.01., 16.01.2012 CaCl ₂ - Behandlung aufgrund Mangel		20. und 28.05.2013 Spruzit 1%ig zur Schädlingsbekämpfung
N-Nachdüngung	16.01.2012	18.05.2012	29.05.2013
SPAD-Werte	nicht erfasst	30.5.2012	22.05., 29.05., 30.05., 05.06., 07.06., 09.06.2013
Ernte	27.01.2012	12.06.2012	13.06.2013

Tab. 9-3: Zusammensetzung der Nährlösung für den Selen-Versuch

Element	mmol/L	Substanz	Stammlösung [mmol L ⁻¹]	Nährlösung [ml 10L ⁻¹]
P	0,1	K ₂ HPO ₄	100	10
K	1,0	K ₂ SO ₄	500	20
Cl	0,2	KCl	200	10
Ca	2,0	Ca(NO ₃) ₂	500	40
Mg	0,5	MgSO ₂	500	10
	μmol/L			
Fe	60	Fe-EDTA	60	10
B	10	H ₃ BO ₃	10	
Mn	2,0	MnSO ₄	2	10
Zn	0,5	ZnSO ₄	0,5	
Cu	0,2	CuSO ₄	0,2	
Mo	0,05	(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	0,05	

Tab. 9-4: Plan und Durchführung des Selen-Versuches V2.1.a und b.

V2. Selen-Versuch	V2.1. a	V2.1. b
Lage :	Gewächshaus	Gewächshaus
Boden :	Nährlösung	Nährlösung
Lichtzeit :	08:00 - 18:00	08:00 - 18:00
Temperatur :	Tag: 18°C, Nacht:14°C	Tag: 18°C, Nacht:14°C
Luftfeuchtigkeit (LrF) :	40%	40%
Topfvolumen :	10L	10L
Anzahl Töpfe (biolog. Wdh) :	24 (3)	8 (1)
Se in μM (mg Na ₂ SeO ₄ Se/L) :	0, 2,5, 5, 10, 40, 80, 120,160 22,65; 30,19)	
Anziehen in Pikiergef. (Quarzsand) :	28.06.2013	28.06.2013
0,3%ige Previkurlsg.:	28.06.2013	28.06.2013
Umtopfen :	10.07.2013	10.07.2013
Vereinzeln auf 1 Pflanze/Topf :	21.07.2013	21.07.2013
Nährlösungswechsel :	21.07., 29.07., 09.08, 20.08, 26.08.	21.07., 29.07., 09.08, 20.08, 26.08.
Art der Blattapplikation :	Pinsel	Sprühen
Se-Blattapplikation :	21.08., 27.08., 02.09. mit je10 ml/Pflanze	27.08., 02.09., 08.09.2013 mit je 10 ml/Pflanze
Problematik :	1. 26.07. + 30.07. extremer Schädlingsbefall mit Spruzit (1%ig), am 07.08. mit Karaté + Zion Behandlung 2. Nekrose-Bildung nach Blattapplikation (durch zu hohe Silwetkonzentration von 0,1%)	
Ernte :	13.09.2013	13.09.2013

Fortsetzung Tab.9-4: Plan und Durchführung des Selen-Versuchs V2.2., V2.3. und V2.4.

V.2.2	V2.3.	V2.4.
Klimakammer	Gewächshaus	Gewächshaus
Nährlösung	Nährlösung	Nährlösung
Tag: 14h, 21 °C	10:00-15:00, nach 7 Tagen	10:00-15:00, nach 7
Nacht: 10h, 14°C	08:00-18:00	Tagen 08:00-18:00
Tag: 21°C, Nacht: 14°C	Tag: 20°C, Nacht: 14°C	Tag: 20°C, Nacht:
Tag: 60% RFT		14°C
Nacht: 70% RFT	40%	40%
5L	10L	10L
32 (4)	32 (4)	20 (4)
0, 5, 10, 40, 80, 120, 160 µM	0, 2,5, 5, 10, 40, 80, 120, 160	0; 0,317; 1,266;
(0; 0,39; 0,79; 3,16; 6,32; 9,48;	µM	12,665; 18,997 µM
12,60 mg Se/L)	(0; 0,47; 0,94; 1,89; 7,55;	(0; 0,5; 2; 20; 30 mg
(0; 0,94; 1,89; 7,55; 15,10; 22,65;	15,10; 22,65; 30,19 mg	Se/Pflanze)
30,19 mg Na ₂ SeO ₄ /L)	Na ₂ SeO ₄)	
13.07.2013	19.09.2013	31.01.2014
13.07.2013	21.09.2013	31.01.2014
09.08.2013	30.09.2013	11.02.2014
15.08.2013	03.10.2013	20.02.2014
20.08.,02.09.,10.09., 17.09.2013	10.10., 13.10., 18.10., 25.10.,	28.02.,06.03., 14.03.,
	03.11., 11.11., 18.11.2013	20.03., 27.03.
Pinsel	Pinsel	Pinsel
Abbruch vor Blattapplikation	7., 12. & 19.11. je 5 ml/Pflanze	21.03., 28.03.2014 je
		10 ml/Pflanze
1. Defekt der Klimakammer ¹	02.10.2013 Thripsebefall	
2. 13.09. Auftragen von		
Biscaya® + Perfekthion ®		
(Institut f. Phytopathologie, CAU		
Kiel) aufgrund Schädlingsbefall		
(19 ml/5L)		
3. Abbruch aufgrund techn. und	22.11.2013	04.04.2014
klimatischer Bedingungen		

¹ Klimakammer stets 7°C unter programmierter Temperatureinstellung. Zudem heizte Klima-kammer nach Schaltung von Nacht auf Tagesrhythmus hoch (5–9°C über die programmierte Temperatur), kühlt jedoch nach 1h wieder stetig ab auf ca.14°C.

Tab. 9-5: Bonitierung der Pak Choi-Pflanzen in V1.1. und V1.2.

Versuch V1.1.					
N°	Pflanze	Blatt	Blatt		Farbe/Symptome
			Anzahl	Größe	
1	S0N1	mittel	13	mittel	Mittelgrün, junge B. anthocyan
2	S0N1	Klein	12	Klein	Jung B. Nekrosen, alt B. Ader + Stiel anthocyan Photo: 129-4204 – 4208
3	S0N1	Klein	13	Klein	Jung B. nur leicht anthocyan, alt B. Ader + Stiel anthocyan, Photo: 129-4214 – 4218
4	S0N1	Klein	10	Klein	Jung B. Nekrosen, hellgrün (teils verwelkt), alt B. Ader + Stiel stark anthocyan, Mitte stark nekrot., Zwei alte B. Verwelkt, Photo: 129-4219 – 4221
5	S0N1	Klein	12	Klein	Jung B. hellgrün, verkümmert, Ader anthocyan, alt B. mittelgrün, anthocyan, leicht nekrotisch, Photo: 129- 4229 – 4238
6	S0N2	Mittel	13	Mittel	Mittelgrün, jung B. leicht hellgrün, alt B. hellgrüne Stellen
7	S0N2	Klein	12-13	Mittel	Mittelgrün, jung B. leicht anthocyane Stiele, alt B. hellgrüne Stellen, Photo: 129-4208 – 4213
8	S0N2	Klein	12	Mittel	Jung B. hellgrün + anthocyan, alt B. dunkelgrün aber hellgrüne Stellen, Stiele nicht anthocyan
9	S0N2	Mittel	11	Mittel	Jung B. normal (mittelgrün), 1 alt B. stark nekrot. Photo: 129-4222 – 4228
10	S0N2	Mittel	13	Klein	Junge B. hellgrün, hellgrüne Stellen, alt B. mittelgrün, Rand nekrotisch
11	S1N1	Mittel	15	mittel	Jung + alt B. mittelgrün, hellgrüne Stellen, leichte Deformierungen (Knoten) auf B.
12	S1N1	Mittel	14	Mittel	Hellgrün
13	S1N1	Groß	15	Groß	Mittelgrün, keine hellen Stellen, an 1 B. hellgrüner Rand
14	S1N1	Groß	16	Groß!	Mittelgrün
15	S1N1	Groß	16	Groß!	Mittel- bis dunkelgrün, gute Entwicklung
16	S1N2	Groß	15	Groß	Alt B. nach unten gekrümmt, gute Entwicklung
17	S1N2	Groß	13	Groß	Mittel- bis dunkelgrün
18	S1N2	Groß!	14	Groß	Alt B. Blattrand leicht hellgrün, leicht hellgrüne Stellen
19	S1N2	Groß!	16	Groß	Mittel- bis dunkelgrün, alt B. nach unten gekrümmt
20	S1N2	Groß!	15	Groß	Alt B. mittel- bis dunkelgrün, hellgrüner Rand
21	S2N1	Groß	15	Groß	Alt B. Mittelgrün, leichte Nekrosen, Photo: 129-4196 – 4203
22	S2N1	Mittel	14	Groß	Leicht mittelgrün
23	S2N1	Mittel	13	Mittel	Alt B. leicht hellgrün, ansonsten mittelgrün, 1 Blattstiel violett (jung)
24	S2N1	Groß	15	Groß	dunkelgrün
25	S2N1	Mittel	15	Groß	Mittelgrün, alt B. leicht hellgrüne Stellen
26	S2N2	Groß	14	Mittel	Mittel- bis dunkelgrün, leicht hellgrüne Stellen
27	S2N2	Groß	16	Groß	Leicht hellgrüne Stellen, ansonsten mittel-dunkelgrün, alt B. Rand nach unten gekrümmt
28	S2N2	Groß	16	Groß	mittel-dunkelgrün alt B. nach unten gekrümmt
29	S2N2	Groß	16	Groß!	Dunkelgrün, alt B. Rand nach unten gekrümmt 1 B. verwelkt (sehr altes B.)
30	S2N2	Groß	14	Groß!	alte B. leichte Nekrosen + nach unten gekrümmt

Fortsetzung Tab.9-5: Bonitierung der Pak Choi-Pflanzen in V1.1. und V1.2.

Versuch V1.2.					
N°	Pflanze	Blatt		Farbe/Symptome	
		Anzahl	Größe		
1	S0N1	Klein	12	Klein/mittel	Jung mittelgrün, Blattrand gekrümmt, alt stark anthocyan und nekrotisch
2	S0N1	Klein	14	Klein	Jung mittel/dunkelgrün, Blattrand gekrümmt, alt stark anthocyan, Blattrand nekrotisch, hellgrün
3	S0N1	Klein	14	Klein	Jung hell/mittelgrün, alt stark nekrotisch, hellgrün, Stiel stark anthocyan
4	S0N1	Klein	14	Klein	Jung hell/mittelgrün (teils verwelkt) nekrot., Unterseite anthocyan, alt anthocyan, Rand nekrotisch Blattunterseite anthocyan
5	S0N2	Mittel	17	Klein/Mittel	Jung hell/mittelgrün, Blattrand gekrümmt, alt hell/mittelgrün Ader + Stiel mittel anthocyan
6	S0N2	Klein	14	Klein	Jung hellgrün Nekrosen, Blattrand gekrümmt, alt hell/mittelgrün Ader + Stiel leicht anthocyan
7	S0N2	Mittel	16	Klein/Mittel	Jung mittelgrün, Alt hell, Blattunterseite leicht anthocyan, nekrotisch
8	S0N2	Mittel	13	Mittel	Jung hellgrün, hellgrüne Stellen, alt hellgrün, Rand nekrotisch, Anthocyanfärbung
9	S1N1	Mittel	17	Mittel	Jung mittel, alt hell/mittelgrün, Rand leicht nekrotisch
10	S1N1	Groß	17	Mittel	Jung dunkel-, alt dunkelgrün, leicht Chlorosen
11	S1N1	Groß	16	Groß	Jung mittelgrün, gesund, alt mittel, Rand leicht nach unten gekrümmt
12	S1N1	Groß	16	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittelgrün, leicht nekrot. Stellen
13	S1N2	Groß	19	Groß	Jung mittel, alt mittel/dunkelgrün, Rand gekrümmt
14	S1N2	Groß!	17	Groß	Jung mittel, Alt mittel Blattrand leicht hellgrün, Nekrot. Rand, Schädlingsbefall! (auch zur Ernte, Spruzit unwirksam)
15	S1N2	Groß!	15	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt Rand nekrotisch
16	S1N2	Groß	15	Groß	Jung mittel/dunkelgrün, alt mittel- bis dunkelgrün, hellgrüner Rand
17	S2N1	Groß	19	Groß	Jung dunkel/mittelgrün, alt mittel (auch in Mitte nekrotische Stellen), Rand nekrotisch
18	S2N1	Mittel	16	Mittel	Jung mittel/dunkelgrün, alt hell/mittelgrün
19	S2N1	Groß	16	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt hell/mittelgrün Nekrot. Rand
20	S2N1	Groß	17	Mittel	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittelgrün
21	S2N2	Groß	19	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittelgrün
22	S2N2	Groß	18	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittel/dunkelgrün leicht hellgrüne Stellen
23	S2N2	Groß	18	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittelgrün
24	S2N2	Groß	18	Groß	Jung mittel- bis dunkelgrün, alt mittelgrün

S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß.

Tab. 9-6: SPAD-Werte der mit variiertem Stickstoff- und Schwefelkonzentration behandelten Pak Choi Pflanzen im Wachstumsverlauf (Versuch V1.3).

	Altes Blatt					
	22.05.20	30.05.	02.06.	05.06.	07.06.	09.06.
S0N1	36.28	36.28	36.28	27.72	23.57	17.80
S1N1	35.93	37.98	38.98	38.93	34.43	27.30
S2N1	35.90	38.80	38.80	35.40	31.88	27.85
S0N2	37.90	38.40	38.40	36.38	34.03	33.23
S1N2	38.33	40.20	40.20	39.78	38.43	37.58
S2N2	38.33	41.33	41.33	40.63	39.30	38.05
Mittleres Blatt						
S0N1	37.75	44.90	45.43	42.35	43.68	42.20
S1N1	36.45	43.43	44.63	46.73	48.50	45.25
S2N1	38.73	46.23	45.20	48.80	48.68	47.75
S0N2	38.10	42.35	41.30	42.23	40.50	39.35
S1N2	39.05	45.95	46.90	51.03	53.28	49.75
S2N2	40.48	49.68	49.40	54.50	56.58	55.83

S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß.

Tab. 9-7: Konzentration der Makronährstoffe, Nitrat, Sulfat, Frischmasse, Trockenmasse und GLS in Versuch V1.1. (A), V1.2. (B) und V1.3. (C).

A	S0N1	S1N1	S2N1	S0N2	S1N2	S2N2	S-Effekt	N-Effekt	N:S-Effekt
N	3,15	3,68	3,66	4,60	4,32	4,68	0,2656	<0,0001	0,1828
S	0,15	0,41	0,58	0,23	0,44	0,64	<0,0001	0,0082	0,9013
N/S	24,68	10,68	7,61	25,55	12,75	7,52	<0,0001	0,5249	0,7832
FM	78,40	202,00	212,40	75,90	251,20	259,80	<0,0001	0,5198	0,1853
TM	9,90	12,30	12,20	6,30	13,90	14,90	<0,0001	0,0458	0,0185
GI	0,02	0,14	0,23	0,04	0,15	0,16	<0,0001	0,0007	0,5053
PRO	0,03	0,07	0,07	0,03	0,05	0,05	0,0005	0,2508	0,2166
GRA	0,02	0,08	0,09	0,03	0,08	0,08	<0,0001	0,1210	0,4315
GNP	0,01	0,38	0,76	0,01	0,33	0,56	<0,0001	0,5746	0,4736
4OH	0,00	0,02	0,02	0,00	0,02	0,03	<0,0001	0,3828	0,0135
GBC	0,00	0,59	1,03	0,00	0,65	0,93	<0,0001	0,4434	0,8788
GB	0,00	0,07	0,16	0,00	0,18	0,20	<0,0001	0,6112	0,0033
GNI	0,00	0,17	0,45	0,01	0,23	0,35	<0,0001	0,0246	0,3803
GRE	0,00	0,03	0,03	0,00	0,01	0,02	<0,0001	0,3034	0,0597
IVM	0,00	0,06	0,07	0,01	0,06	0,11	<0,0001	0,0004	0,1255
NGB	0,02	0,31	0,65	0,04	0,26	0,57	<0,0001	0,2272	0,6595
GLS	0,11	1,91	3,55	0,17	2,03	3,07	<0,0001	0,0212	0,7040
ali	0,08	1,28	2,2	0,12	1,27	1,81	<0,0001	0,0681	0,6607
aro	0,00	0,17	0,45	0,01	0,23	0,35	<0,0001	0,0246	0,3803
ind	0,02	0,46	0,9	0,04	0,53	0,91	<0,0001	0,0773	0,8764

Fortsetzung Tab.: 9-7

B	S0N1	S1N1	S2N1	S0N2	S1N2	S2N2	S-Effekt	N-Effekt	N:S-Effekt
N	2,11	1,82	1,83	2,61	2,46	2,45	0,0022	<0,0001	0,4855
S	0,07	0,19	0,47	0,07	0,20	0,49	<0,0001	0,8136	0,2667
N/S	30,68	10,97	3,95	39,73	13,38	5,13	<0,0001	<0,0001	0,0219
NO3	6,27	7,26	4,29	57,71	56,37	24,59	<0,0001	<0,0001	0,0004
SO4	0,09	1,09	5,10	0,16	1,26	4,59	<0,0001	0,3254	0,8123
FM	86,4	413,5	410,1	111,5	416,9	524,5	<0,0001	0,0014	0,0113
TM	10,0	23,0	21,2	11,6	22,3	25,5	<0,0001	0,0083	0,0929
GI	0,04	0,06	0,25	0,03	0,06	0,19	<0,0001	0,3473	0,4359
PRO	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,8655	0,1500	0,9456
GRA	0,07	0,04	0,04	0,07	0,04	0,06	0,0009	0,0073	0,0450
GNP	0,00	0,17	3,31	0,00	0,20	2,55	<0,0001	0,6908	0,1089
4OH	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	<0,0001	0,3656	0,0981
GBC	0,02	0,11	2,51	0,01	0,19	2,40	<0,0001	0,3533	0,5101
GB	0,00	0,01	0,21	0,00	0,03	0,62	<0,0001	0,9181	0,0113
GNI	0,00	0,07	0,52	0,00	0,09	0,62	<0,0001	0,1490	0,1239
GRE	0,00	0,02	0,15	0,00	0,02	0,09	<0,0001	0,1588	0,0166
IVM	0,01	0,03	0,10	0,01	0,04	0,15	<0,0001	0,1783	0,1449
NGB	0,00	0,02	0,09	0,01	0,04	0,27	<0,0001	0,0426	<0,0001
GLS	0,21	0,57	7,25	0,19	0,77	7,03	<0,0001	0,5486	0,6667
ali	0,19	0,44	6,31	0,17	0,56	5,35	<0,0001	0,6054	0,3318
aro	0,00	0,07	0,52	0,00	0,09	0,62	<0,0001	0,1490	0,1239
ind	0,02	0,06	0,41	0,01	0,12	1,06	<0,0001	0,8292	0,0032
C	S0N1	S1N1	S2N1	S0N2	S1N2	S2N2			
N	2.51	2.35	2.27	3.61	3.05	2.79			
S	0.09	0.24	0.48	0.08	0.25	0.48			
N/S	27.02	9.39	4.49	46.89	12.92	6.47			
NO3	6.36	7.02	3.97	43.71	52.85	22.18			
SO4	0.15	1.14	3.95	0.09	1.35	3.84			
FM	323.2	437.8	448.1	325.0	511.5	589.8			
TM	32.9	35.5	37.7	35.1	37.2	48.0			
GI	0.03	0.09	0.15	0.03	0.06	0.14			
PRO	0.11	0.12	0.17	0.08	0.11	0.11			
GRA	0.09	0.09	0.15	0.05	0.09	0.10			
GNP	0.09	0.89	3.05	0.04	0.52	2.44			
4OH	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02			
GBC	0.04	0.81	2.65	0.03	0.37	2.22			
GB	0.00	0.05	0.16	0.00	0.07	0.29			
GNI	0.02	0.21	0.42	0.01	0.11	0.33			
GRE	0.00	0.02	0.06	0.00	0.01	0.04			
IVM	0.04	0.09	0.13	0.03	0.07	0.16			
NGB	0.02	0.07	0.10	0.02	0.05	0.13			
GLS	0.44	2.45	7.05	0.29	1.46	5.99			
ali	0.36	2.03	6.23	0.23	1.15	5.05			
aro	0.02	0.21	0.42	0.01	0.11	0.33			
ind	0.07	0.22	0.40	0.05	0.20	0.60			

S0=0, S1=60, S2=300 mg S/Gef.; N1=0,75, N2=1,5 g N/Gef., Stickstoff(N), Schwefel(S), Nitrat(NO₃), Sulfat(SO₄), Frischmasse(FM), Trockenmasse(TM), Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin(GRA), Gluconapin(GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin(4OH), Glucobrassicinapin(GBC), Glucobrassicin(GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), Glucosinolate (GLS), aliphatisch (ali), aromatisch (aro), indolisch (ind).

Tab. 9-8: Nährstoffgehalte des in V1.1. verwendeten Bodens (Ostenfeld) nach Laboranalyse

Probe	Kalkversorgung			Phosphor		Kalium		Magnesium		Schwefel	Stickstoff	Org. Substanz	C/N
	pH-Wert	pH-Stufe	Optimaler pH-Bereich	P ₂ O ₅ [mg/100 g]	G.-S.	K ₂ O [mg/100 g]	G.-S.	Mg [mg/100 g]	G.-S.	S [mg/kg]	N _{ges} [%]	[%]	C/N-Verhältnis
Ostenfeld	5,5	B	5,8–6,3	17	B	12	B	4,0	A	4,9	0,13	2,3	10

G.-S. = Gehaltsstufe (festgelegt nach LUFA.itl GmbH, Kiel)

Tab. 9-9: Konzentration aller während der IC-Messung analysierten Parameter in jungem und altem Blattmaterial von Pak Choi.

V1.3.	junges Blatt									altes Blatt										
	NO ₃ -N	SE	NO ₃	SE	SO ₄ -S	SE	SO ₄	SE	AsA	SE	NO ₃ -N	SE	NO ₃	SE	SO ₄ -S	SE	SO ₄	SE	AsA	SE
S0N1	1.47	0.47	6.49	2.09	0.10	0.01	0.30	0.02	8.12	0.59	1.41	0.31	6.22	1.39	0.02	0.02	0.06	0.06	10,00	1.89
S1N1	0.77	0.39	3.42	1.74	0.46	0.07	1.37	0.20	7.13	0.76	2.28	0.95	10.11	4.21	0.31	0.06	0.92	0.18	7,40	0.97
S2N1	0.34	0.11	1.50	0.49	1.53	0.06	4.57	0.18	5.75	0.29	1.37	0.28	6.08	1.24	1.29	0.16	3.86	0.47	11,18	0.74
S0N2	7.59	0.69	33.59	3.07	0.00	0.00	0.00	0.00	3.28	0.37	11.51	4.04	50.97	17.91	0.06	0.02	0.18	0.05	11,71	2.50
S1N2	6.96	0.66	30.80	2.92	0.58	0.13	1.74	0.38	4.82	0.23	16.46	1.09	72.85	4.84	0.32	0.01	0.95	0.04	9,01	1.30
S2N2	2.17	0.37	9.61	1.63	1.28	0.22	3.84	0.66	2.92	0.10	7.53	1.06	33.34	4.68	1.20	0.18	3.61	0.54	8,92	0.49

V1.2.	Gesamte Pflanze																			
	NO ₃ -N	SE	NO ₃	SE	SO ₄ -S	SE	SO ₄	SE	AsA	SE	Cl	SE	C ₄ H ₆ O ₅	SE	Oxalat	SE	PO ₄	SE	PO ₄ -P	SE
S0N1	8,17	0,77	36,16	3,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,39	0,54	14,45	1,40	28,72	2,32	0,74	0,11	4,15	0,61	12,79	1,88
S0N1	8,17	0,77	36,16	3,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,39	0,54	13,91	1,67	27,79	2,17	0,72	0,06	3,96	0,29	12,19	0,90
S1N1	12,39	1,30	54,85	5,75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,57	0,79	24,04	2,16	32,14	1,59	0,74	0,06	3,56	0,31	10,99	0,95
S2N1	3,23	1,08	14,28	4,79	0,12	0,03	0,37	0,09	5,18	0,70	17,09	0,41	22,80	1,21	0,80	0,08	3,33	0,23	10,26	0,71
S0N2	15,18	1,84	67,20	8,12	0,19	0,05	0,56	0,14	6,64	0,37	19,76	0,81	30,05	1,27	0,79	0,02	3,10	0,13	9,54	0,41
S1N2	2,39	0,38	10,57	1,68	2,38	0,55	7,13	1,64	6,57	0,21	15,87	0,74	23,72	0,52	0,72	0,01	2,60	0,07	8,02	0,21
S2N2	12,90	0,43	57,11	1,89	2,07	0,11	6,19	0,33	8,70	0,31	7,53	1,06	33,34	4,68	1,20	0,18	3,61	0,54	8,92	0,49

Nitrat (NO₃), N-Gehalt in Nitrat (NO₃-N), Sulfat (SO₄), S-Gehalt in Sulfat (SO₄-S), Ascorbinsäure (AsA), Chlorid (Cl), Äpfelsäure (C₄H₆O₅), Standardfehler der detektierten Parameter (SE), S0 = 0 mg S/Gefäß, S1 = 60 mg S/Gefäß, S2 = 300 mg S/Gefäß, N1 = 0,75 g N/Gefäß, N2 = 1,5 g N/Gefäß.

Tab. 9-10: Gesamtkonzentration und individuelle GLS-HP sowie ITC, Nitrile und Epithionitrile und deren Verhältnis zueinander in mit N und S behandelten Pak Choi-Pflanzen (Versuch V1.3.).

	GLS-HP	4Pent-CN	3But-ITC	4Pent-ITC	Epi 3But	2PE-CN	Epi 4Pent	2PE-ITC	IACN	ITC	Nitril	Epi	ITC/Nitril	ITC/Epi
S0N1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S0N2	0.668	0.089	0.013	0.012	0.279	0.034	0.225	0.010	0.004	0.035	0.128	0.505	0.247	0.063
S1N1	1.219	0.127	0.038	0.070	0.459	0.038	0.469	0.014	0.004	0.122	0.169	0.928	0.703	0.127
S1N2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
S2N1	0.405	0.075	0.003	0.002	0.153	0.022	0.143	0.003	0.003	0.009	0.100	0.296	0.088	0.030
S2N2	1.137	0.125	0.019	0.039	0.439	0.047	0.446	0.012	0.009	0.070	0.182	0.886	0.383	0.079

Glucosinolat-Hydrolyseprodukte (GLS-HP), 4-Pentenyl-Cyanid (4Pent-CN), 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates (Epi 3But), 2-Phenylethyl-Cyanid (2PECN), Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent), 2-Phenylethyl-Isothiocyanat (2PEITC), Indolacetonitril (IACN), Isothiocyanat (ITC), Epithionitril (Epi).

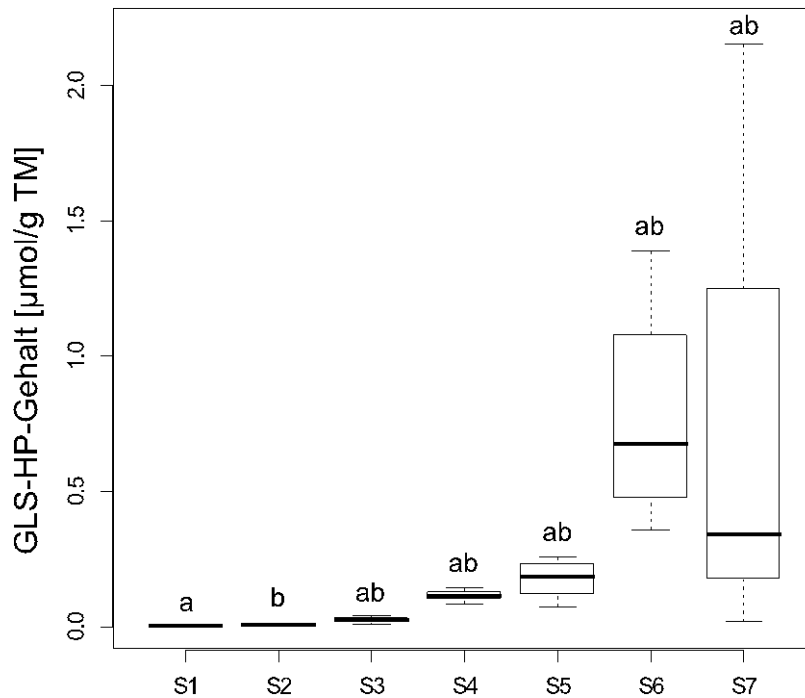


Abb. 9-5: Konzentration der GLS-HP in einem S-Steigerungsvorversuch mit *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* Yuki. S1 = 0, S2 = 10, S3 = 30, S4 = 60, S5 = 100 S6 = 300 und S7 = 600 mg S/Gefäß, Anova mit $p < 0,05$, S-Effekt in Kleinbuchstaben.

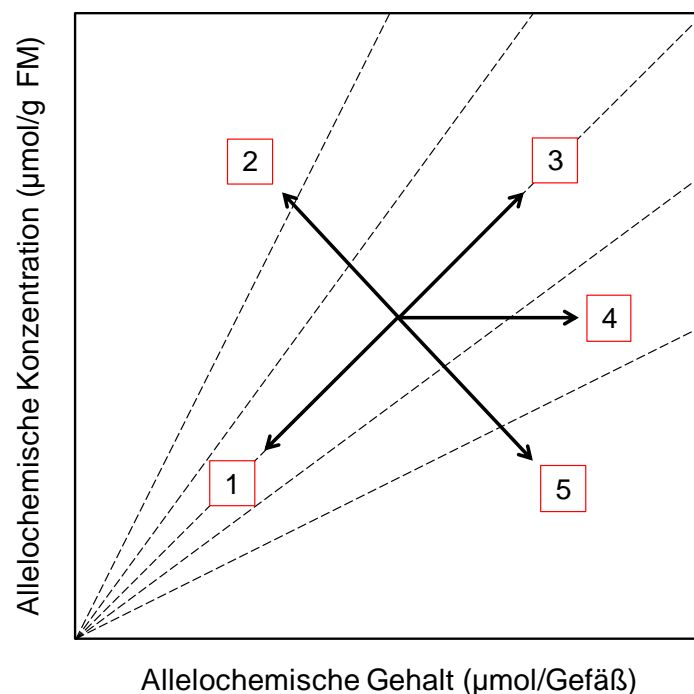


Abb. 9-6: Graphische Darstellung in Form von Vektorgraphiken zur Interpretation von phenotypischen Variationen auf die Konzentration von Inhaltsstoffen (nach *Koricheva*, 1999). 1 = reduzierte Synthese, 2 = Aufkonzentrierung, 3 = erhöhte Synthese, 4 = steady state, 5 = Verdünnungseffekt.

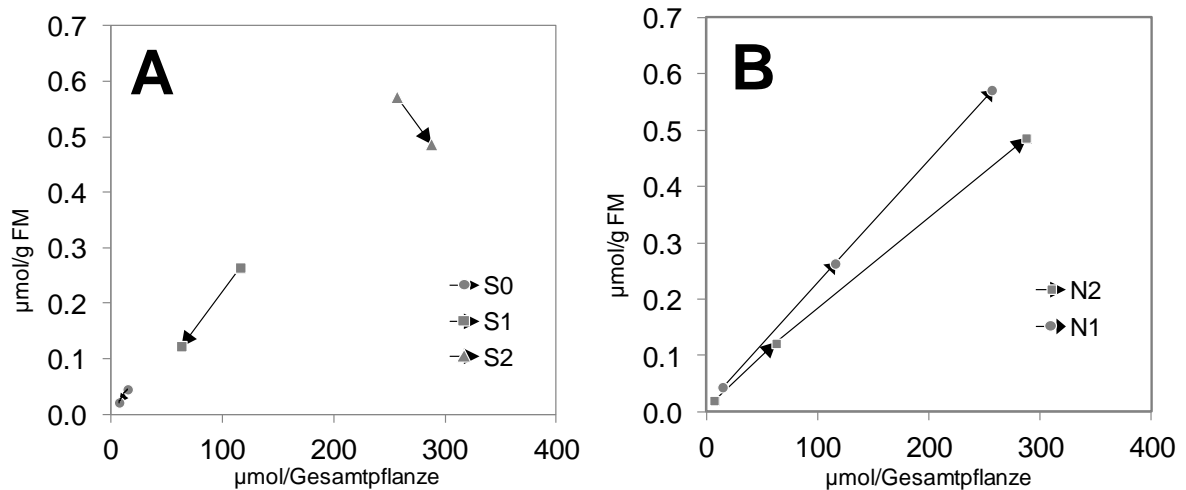


Abb. 9-7: Vektorgraphische Darstellung des Düngungseffektes auf die Konzentration der GLS-Gesamtkonzentration in Frischmasse von Pak Choi (nach *Koricheva*, 1999). Mit konstanter S- und variierter N-Düngung erfolgte eine reduzierte GLS-Synthese, insbesondere unter S-Mangelbedingungen kam es zu einem Verdünnungseffekt (A). Mit konstanter N- und variierter S-Düngung kam es zu einer deutlich erhöhten Synthese der GLS (B) ohne Auftreten eines Verdünnungseffektes.

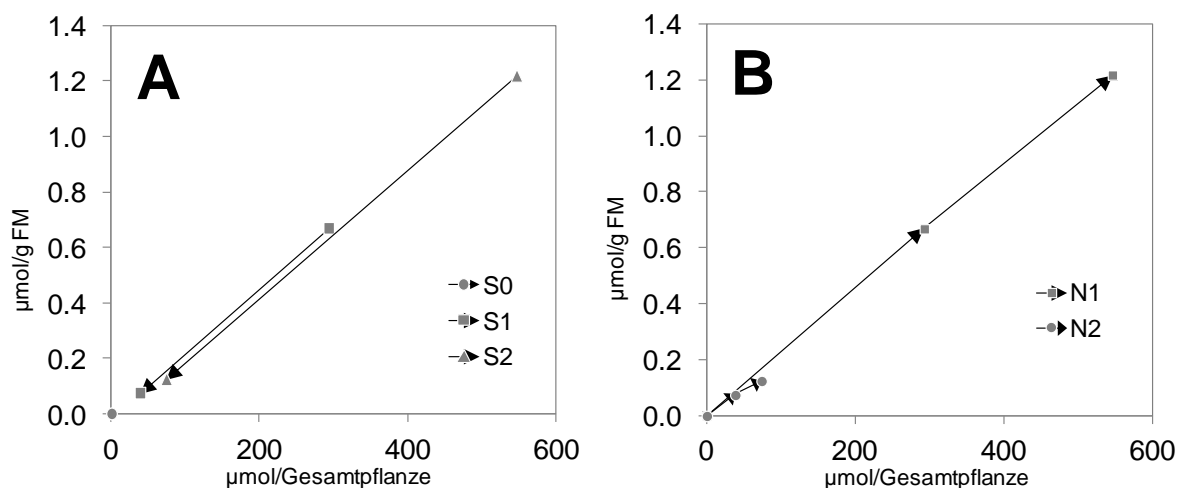


Abb. 9-8: Vektorgraphische Darstellung des Düngungseffektes auf die Konzentration der GLS-HP-Gesamtkonzentration in Frischmasse von Pak Choi (nach *Koricheva*, 1999). Mit konstanter N- und variierter S-Düngung erfolgte eine erhöhte Synthese der GLS-HP (A), während mit variierter N und konstanter S-Düngung ein reduzierte Synthese detektiert wurde (B). In beiden Fällen trat kein Verdünnungseffekt auf.

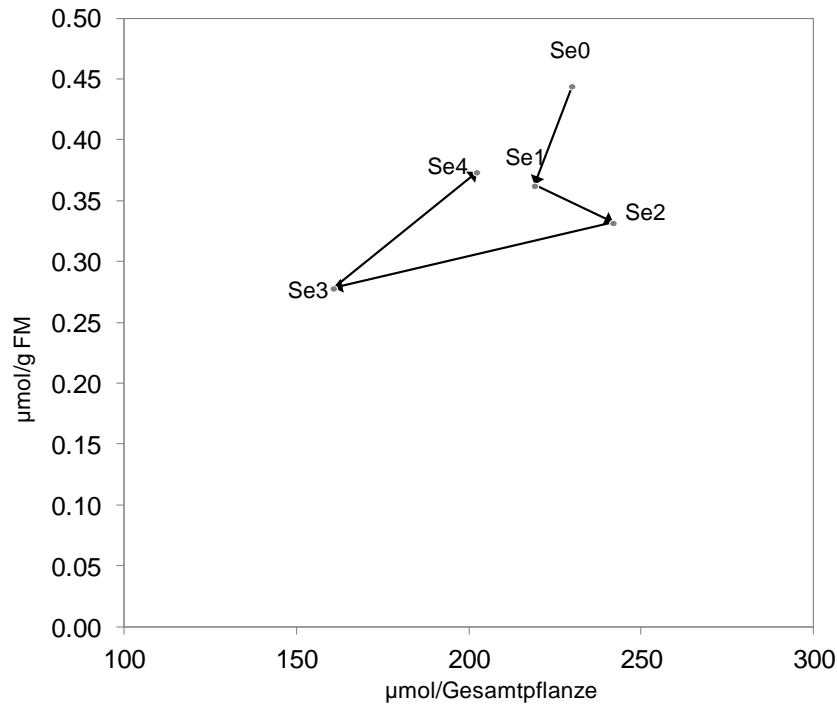


Abb. 9-9: Darstellung der Konzentrationsentwicklung der GLS mit applizierter Se-Dosis (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se3 = 2, Se3 = 20 und Se4 = 30 mg Se/Pflanze) in Pak Choi. Jegliche Düngungseffekte sind aufgrund der nicht vorliegenden Signifikanz auszuschließen.

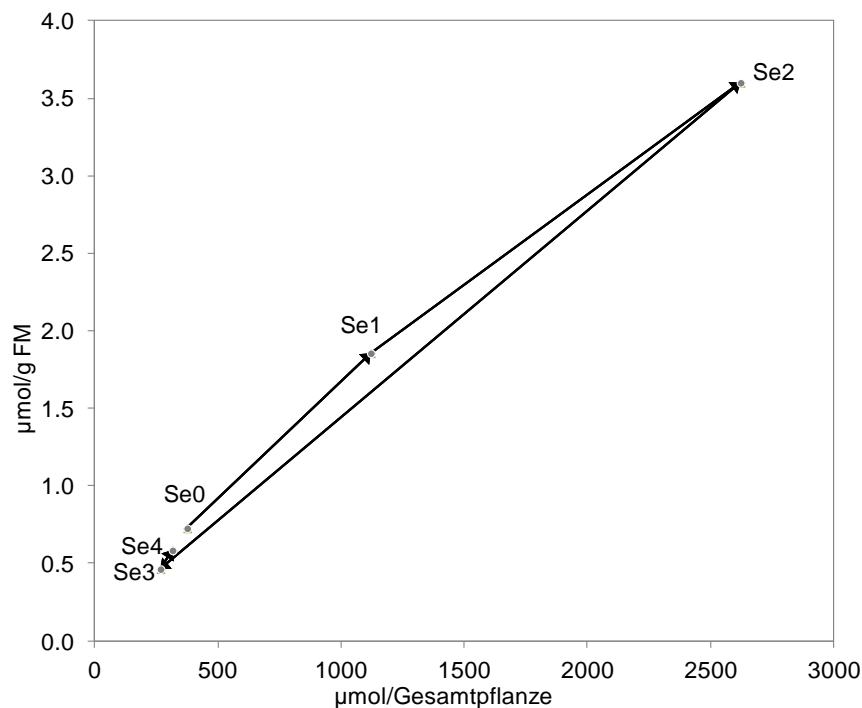


Abb. 9-10: Darstellung der Konzentrationsentwicklung der GLS-HP mit über das Blatt applizierte Se-Konzentrationen (Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se3 = 2, Se3 = 20 und Se4 = 30 mg Se/Pflanze) in Pak Choi. Mit zunehmender Se-Konzentration bis 2 mg/Pflanze erfolgte eine erhöhte Synthese der GLS-HP, während mit weiter ansteigender Se-Konzentration die Synthese wieder reduziert wurde. Ein Verdünnungseffekt fand nicht statt.

Tab. 9-11: Detektierte Parameter in V1.1. nach Fraktionierung des Pflanzenmaterials in Jung, Alt, Blattstiel und -spreite.

Fraktion	Stufe	FM	TM	N	S	N/S	GI	PRO	GRA	GNP	4OH	GBC	GB	GNI	GRE	4M	NGBS	GLS
AB	S0N1	39.23	5.14	2.49	0.16	18.01	0.011	0.007	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.043
	S1N1	76.42	3.78	3.66	0.29	12.60	0.079	0.034	0.057	0.210	0.017	0.390	0.015	0.052	0.000	0.051	0.139	2.064
	S2N1	78.29	4.40	4.71	0.75	7.36	0.061	0.009	0.038	0.449	0.011	0.942	0.060	0.111	0.000	0.041	0.344	0.122
	S0N2	38.51	2.86	4.43	0.22	20.93	0.036	0.024	0.041	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.005	1.344
	S1N2	99.11	5.30	4.88	0.41	12.99	0.056	0.000	0.047	0.223	0.015	0.617	0.031	0.094	0.000	0.058	0.203	2.097
	S2N2	100.71	5.66	5.91	0.92	6.66	0.045	0.019	0.055	0.400	0.028	0.943	0.104	0.092	0.000	0.080	0.331	0.099
AS	S0N1	31.04	3.97	2.81	0.07	40.34	0.027	0.050	0.014	0.008	0.001	0.009	0.004	0.004	0.000	0.000	0.005	1.007
	S1N1	101.31	5.97	2.55	0.10	15.18	0.062	0.091	0.058	0.197	0.020	0.305	0.020	0.094	0.000	0.023	0.135	1.339
	S2N1	106.51	5.88	3.30	0.51	8.66	0.117	0.068	0.027	0.295	0.015	0.345	0.036	0.136	0.000	0.029	0.272	0.375
	S0N2	25.44	2.11	4.26	0.49	46.12	0.023	0.036	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.035	1.265
	S1N2	123.73	6.33	3.68	0.18	19.54	0.128	0.087	0.043	0.271	0.022	0.405	0.026	0.133	0.000	0.023	0.127	1.549
	S2N2	128.10	6.87	4.84	0.59	8.40	0.106	0.054	0.034	0.371	0.030	0.483	0.062	0.115	0.000	0.051	0.244	0.266
JB	S0N1	4.87	0.76	3.40	0.18	19.20	0.049	0.071	0.051	0.069	0.001	0.006	0.000	0.018	0.000	0.000	0.111	6.067
	S1N1	7.83	1.39	2.93	0.55	5.36	0.362	0.067	0.139	1.381	0.036	2.039	0.333	0.215	0.011	0.166	1.318	10.328
	S2N1	12.04	0.98	2.64	0.47	6.58	0.586	0.104	0.244	2.333	0.051	3.331	0.781	0.485	0.000	0.222	2.192	0.413
	S0N2	4.31	0.96	4.08	0.24	18.36	0.045	0.041	0.031	0.058	0.002	0.004	0.003	0.015	0.000	0.003	0.063	5.085
	S1N2	12.96	1.08	3.28	0.51	8.60	0.348	0.065	0.221	0.929	0.045	1.956	0.553	0.375	0.000	0.171	0.421	6.041
	S2N2	14.48	1.15	3.17	0.43	7.40	0.352	0.082	0.197	1.064	0.061	2.224	0.710	0.252	0.000	0.199	0.900	0.748
JS	S0N1	7.25	0.53	3.89	0.21	21.19	0.043	0.059	0.048	0.057	0.004	0.000	0.001	0.015	0.002	0.000	0.185	11.035
	S1N1	12.90	0.72	5.38	0.67	8.16	1.424	0.127	0.452	2.089	0.055	2.767	0.359	2.246	0.359	0.215	0.941	16.137
	S2N1	15.55	0.97	4.32	0.59	7.82	1.297	0.136	0.391	3.323	0.025	3.040	0.593	3.554	0.394	0.322	3.062	16.137
	S0N2	7.67	0.41	5.62	0.36	16.81	0.039	0.082	0.067	0.074	0.005	0.020	0.000	0.183	0.008	0.000	0.269	8.134
	S1N2	15.43	1.15	5.45	0.61	9.89	0.688	0.127	0.329	1.178	0.035	1.786	0.457	1.801	0.160	0.225	1.348	13.316
	S2N2	16.47	1.20	4.79	0.64	7.62	0.933	0.138	0.316	1.959	0.040	2.209	0.924	2.843	0.250	0.465	3.240	13.316

S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75 und N2 = 1,5 g N/Gefäß, altes Blatt (AB), alter Stiel (AS), junges Blatt (JB), junger Stiel (JS), Trockenmasse (TM), Stickstoff (N), Schwefel (S), Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB).

Tab. 9-12: Signifikanz der ermittelten Parameter (N-, S- und interaktiver N:S-Effekt) in Versuch V1.3.

	S-Effekt		N-Effekt		S:N-Effekt	
FM	<0,0001	***	<0,0120	***	0,0561	o
TM	<0,0001	***	<0,0002	***	<0,0072	***
N	0,0053	**	<0,001	***	0,1430	n.s.
S	<0,0001	***	0,1834	n.s.	0,5001	n.s.
N/S	<0,0001	***	<0,0001	***	<0,0079	***
Nitrat	<0,0001	***	<0,0001	***	<0,0003	***
Sulfat	<0,0001	***	0,4469	n.s.	0,4524	n.s.
GLS	<0,0001	***	0,0021	**	0,1507	n.s.
Ali	<0,0001	***	0,0010	***	0,1442	n.s.
Aro	<0,0001	***	0,0170	**	0,0205	***
Ind	<0,0001	***	0,5439	n.s.	0,0066	**
GI	<0,0001	***	<0,9944	n.s.	<0,0655	n.s.
PRO	<0,0001	***	<0,0001	***	<0,0337	*
GRA	<0,0001	***	<0,0001	***	<0,0062	**
GNP	<0,0001	***	0,0011	**	0,1749	n.s.
4OH	<0,0001	***	0,0739	n.s.	0,0617	n.s.
GBC	<0,0001	***	0,5101	n.s.	0,0545	o
GB	<0,0001	***	0,4878	n.s.	0,0006	***
GNS	<0,0001	***	0,0170	*	0,0205	*
GRE	<0,0001	***	0,4598	n.s.	0,0157	*
IVM	<0,0001	***	0,0753	n.s.	0,1312	n.s.
NGB	<0,0001	***	0,1833	n.s.	0,1331	n.s.
GLS-HP	<0,0001	***	0,1699	n.s.	0,4052	n.s.
ITC	0,0001	***	0,1107	n.s.	0,3854	n.s.
Nitril	<0,0001	***	0,3838	n.s.	0,0657	n.s.
Epi	<0,0001	***	0,2034	n.s.	0,3886	n.s.
ITC/Nitril	<0,0001	***	0,0558	o	0,2469	n.s.
2PE-ITC	<0,0001	***	0,2072	n.s.	0,4085	n.s.
3But-ITC	0,0011	***	0,1026	n.s.	0,3908	n.s.
4Pent-ITC	<0,0001	***	0,1096	n.s.	0,2533	n.s.
2PE-CN	<0,0001	***	0,7045	n.s.	0,0649	n.s.
4Pent-CN	<0,0001	***	0,1976	n.s.	0,3211	n.s.
IACN	<0,0001	***	0,1104	n.s.	0,0012	n.s.
Epi 3But	0,0011	***	0,1751	n.s.	0,3060	n.s.
Epi 4Pent	<0,0001	***	0,2627	n.s.	0,5291	n.s.

Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Selen; Frisch- (FM), Trockenmasse (TM); Stickstoff (N), Schwefel (S), Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (N/S), Selen (Se), Glucosinolate (GLS), aliphatische GLS (ali), aromatische GLS (aro), indolische GLS (ind), Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxy-glucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxy-glucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), Glucosinolat-Hydrolyseprodukte (GLS-HP), 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolates (Epi 3But), Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent).

Tab. 9-13: Umrechnung der in V1.3. detektierten GLS in µg/g TM und µmol/g FM in mit N und S gedüngten Pak Choi-Pflanzen.

µg/g TM															
	GI	PRO	GRA	GNP	4OH	GBC	GB	GNI	GRE	4M	NGB	GLS	ali	aro	ind
S0N1	0,015	0,047	0,042	0,037	0,0006	0,016	0,002	0,010	0,001	0,019	0,010	0,199	0,158	0,010	0,031
S1N1	0,041	0,053	0,045	0,384	0,0044	0,360	0,023	0,090	0,007	0,042	0,032	1,081	0,889	0,090	0,102
S2N1	0,069	0,073	0,070	1,308	0,0063	1,176	0,071	0,180	0,028	0,060	0,048	3,089	2,723	0,180	0,186
S0N2	0,016	0,032	0,024	0,017	0,0023	0,013	0,001	0,005	0,001	0,012	0,007	0,130	0,103	0,005	0,023
S1N2	0,029	0,047	0,041	0,222	0,0039	0,164	0,029	0,046	0,003	0,035	0,025	0,646	0,506	0,046	0,094
S2N2	0,065	0,047	0,048	1,048	0,0089	0,985	0,129	0,143	0,018	0,077	0,063	2,632	2,211	0,143	0,278

µmol/g FM															
	GI	PRO	GRA	GNP	4OH	GBC	GB	GNI	GRE	4M	NGB	GLS	ali	aro	ind
S0N1	0,0013	0,011	0,009	0,009	0,0001	0,004	0,000	0,002	0,0001	0,004	0,0021	0,043	0,034	0,002	0,007
S1N1	0,0007	0,010	0,008	0,073	0,0008	0,066	0,004	0,017	0,0013	0,007	0,0054	0,193	0,159	0,017	0,018
S2N1	0,0013	0,014	0,012	0,255	0,0011	0,223	0,013	0,035	0,0053	0,011	0,0083	0,580	0,511	0,035	0,033
S0N2	0,0004	0,008	0,006	0,004	0,0005	0,003	0,000	0,001	0,0001	0,003	0,0016	0,028	0,022	0,001	0,005
S1N2	0,0004	0,008	0,006	0,038	0,0006	0,027	0,005	0,008	0,0005	0,005	0,0038	0,102	0,080	0,008	0,015
S2N2	0,0013	0,009	0,008	0,206	0,0016	0,183	0,024	0,028	0,0035	0,014	0,0110	0,490	0,412	0,028	0,050

S0 = 0, S1 = 60, S2 = 300 mg S/Gefäß; N1 = 0,75, N2 = 1,5 g N/Gefäß; Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxy-glucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), Glucosinolate (GLS), aliphatisch (ali), aromatisch (aro), indolisch (ind).

Tab. 9-14: Die in Pak Choi detektierten GLS und die korrespondierenden GLS-HP.

GLS	GLS-HP	Charakter
Glucoiberin	Iberin	Aliphatisch
Progoitrin	Goitrin	Aliphatisch
Glucoraphanin	Sulforaphan, Goitrin	aliphatisch
Gluconapin	3But-ITC, Epi 3But	Aliphatisch
4-Hydroxyglucobrassicin	IACN	Indolisch
Glucobrassicinapin	Epi 4Pent, 4Pent-ITC, -CN	aliphatisch
Glucobrassicin	IACN	Indolisch
Gluconasturtiin	2PE-ITC, -CN	Aromatisch
Glucoraphenin	Sulforaphen	Aliphatisch
4-Methoxyglucobrassicin	IACN	Indolisch
Neoglucobrassicin	IACN	Indolisch

3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolats (Epi 3But), Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent). Die grau beschrifteten GLS-HP wurden im Versuchsmaterial nicht detektiert.

Tab. 9-15: Applizierte Mengen [ml] der Selenlösung pro Pflanze

Pflanze	1. Applikation	2. Applikation	Total [ml]	MW
1	10,88	09,30	20,18	20,10
2	09,97	10,20	20,17	
3	10,02	09,87	19,89	
4	10,23	09,93	20,16	
5	11,34	09,10	20,44	20,18
6	10,51	09,87	20,38	
7	09,59	10,26	19,85	
8	10,16	09,87	20,03	
9	11,08	09,21	20,29	20,32
10	09,73	10,82	20,55	
11	08,82	10,98	19,80	
12	10,87	09,76	20,63	
13	08,82	11,39	20,21	20,21
14	09,14	10,89	20,03	
15	07,21	12,79	20,00	
16	09,78	10,62	20,40	
17	09,57	11,19	20,76	20,17
18	07,54	12,40	19,94	
19	10,64	09,39	20,03	
20	08,34	11,59	19,93	

Tab. 9-16: Mittelwerte der im Selen-Versuch (V2.4.) detektierten Parameter mit Angabe der statistischen Signifikanz.

	Einheit	Se0	Se1	Se2	Se3	Se4	p-value	Signifikanz
FM	g	517,39	604,31	728,52	577,67	541,30	0,0001	***
TM	g	35,46	38,13	41,43	33,58	32,98	0,0035	**
N	%	3,43	3,45	3,47	3,56	3,49	0,8194	n.s.
S	%	0,62	0,75	0,75	1,17	1,05	5,033e-06	***
N/S	Einheitslos	5,52	4,62	4,70	3,08	3,37	1,029e-07	***
Se	mg/kg TM	0,136	7,825	25,825	324,75	442,00	1,628e-10	***
Se/Pfl	mg/Pflanze	0,005	0,296	1,068	10,902	14,517	9,161e-11	***
GI	µmol/g TM	0,227	0,270	0,246	0,223	0,293	0,2361	n.s.
PRO	µmol/g TM	0,076	0,059	0,057	0,052	0,077	0,02324	*
GRA	µmol/g TM	0,074	0,063	0,071	0,058	0,070	0,4590	n.s.
GNP	µmol/g TM	2,325	2,116	2,086	1,559	1,978	0,1500	n.s.
4OH	µmol/g TM	0,268	0,166	0,167	0,123	0,161	0,0244	*
GBC	µmol/g TM	1,558	1,408	1,801	1,332	1,639	0,3543	n.s.
GB	µmol/g TM	0,896	0,637	0,473	0,515	0,805	0,0250	*
GNS	µmol/g TM	0,473	0,426	0,378	0,360	0,393	0,2734	n.s.
GRE	µmol/g TM	0,075	0,104	0,103	0,090	0,118	0,1483	n.s.
IVM	µmol/g TM	0,507	0,494	0,476	0,470	0,592	0,5173	n.s.
NGB	µmol/g TM	0,009	0,006	0,003	0,005	0,006	0,2201	n.s.
GLS	µmol/g TM	6,487	5,748	5,861	4,787	6,132	0,2590	n.s.
Ali	µmol/g TM	4,335	4,020	4,363	3,314	4,176	0,3468	n.s.
Aro	µmol/g TM	0,473	0,426	0,378	0,360	0,393	0,2734	n.s.
Ind	µmol/g TM	1,679	1,303	1,120	1,113	1,563	0,0874	n.s.
3But-ITC	µmol/g FM	0,035	0,110	0,131	0,028	0,030	0,0075	**
4Pent-ITC	µmol/g FM	0,087	0,264	0,380	0,083	0,094	0,0108	*
Epi 3But	µmol/g FM	0,239	0,673	1,327	0,064	0,148	0,0002	***
Epi 4Pent	µmol/g FM	0,311	0,715	1,569	0,234	0,255	0,0002	***
GLS-HP	µmol/g FM	0,672	1,761	3,407	0,410	0,527	0,0002	***
ITC	µmol/g FM	0,122	0,374	0,511	0,111	0,124	0,0092	***
Epi	µmol/g FM	0,550	1,387	2,896	0,298	0,403	0,0002	***
ITC/Epi	Einheitslos	0,221	0,294	0,168	0,409	0,332	0,2477	n.s.

Se0 = 0, Se1 = 0,5, Se2 = 2, Se3 = 20, Se4 = 30 mg Selen; Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM), Stickstoff (N), Schwefel (S), Stickstoff-Schwefel-Verhältnis (N/S), Selen (Se), Selen pro Pflanze (Se/Pfl), Glucosinolate (GLS), aliphatisch (ali), aromatisch (aro), indolisch (ind), Glucoiberin (GI), Progoitrin (PRO), Glucoraphanin (GRA), Gluconapin (GNP), 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH), Glucobrassicinapin (GBC), Glucobrassicin (GB), Gluconasturtiin (GNI), Glucoraphenin (GRE), 4-Methoxyglucobrassicin (4M), Neoglucobrassicin (NGB), 3-Butenyl-Isothiocyanat (3But-ITC), 4-Pentenyl-Isothiocyanat (4Pent-ITC), Epithionitril des 3-Butenyl-Glucosinolats (Epi 3But), Epithionitril des 4-Pentenyl-Glucosinolates (Epi 4Pent), n.s. = nicht signifikant.

CURRICULUM VITAE

Name: Caroline Heyer, M.Sc.
Geburtsdatum: 20.10.1983
Geburtsort: Trier
Nationalität: Deutsch/Französisch
Email: Caroline_Heyer@gmx.de

Akademische Ausbildung

- 28.01.2015 Disputation zum Dr.oec.troph. am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Thema: Optimierung von Glucosinolaten und deren Hydrolyseprodukte in Pak Choi mittels einer variierten Schwefel-Stickstoff-Düngung sowie Selenblattapplikation
- 10/2011 - Promotion am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde (Dr. oec. troph.),
01/2015 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 03.05.2011 Abschluss M.Sc. Ökotrophologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Thema: Bestimmung von Glucosinolaten und Isothiocyanaten in *Brassica pekinensis* nach steigendem Schwefelangebot – Einfluss auf Nrf2-Transaktivierung in HT-29-Zellen
- 10/2008 - Studium der Ökotrophologie (M.Sc.), Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
03/2011
- 10.09.2008 Abschluss B.Sc. Ökotrophologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
Thema: Resveratrol und dessen kardioprotektive Wirkung
- 10/2004 - Studium der Ökotrophologie (B.Sc.), Justus-Liebig-Universität Gießen
09/2008
- 09/2003 - Studium der Lebensmitteltechnik (Diplomstudium mit Zwischenprüfungen),
08/2004 Fachhochschule Trier

Schulische Ausbildung

- 31.03.2003 Allgemeine Hochschulreife und Baccalauréat Série Scientifique (Bilinguales Abitur)
Hindenburg Gymnasium, Trier
- 08/1994 - Hindenburg Gymnasium, Trier
03/2003
- 08/1994 - Sankt Matthias Grundschule, Trier
03/2003

Kiel, den 10.7.2015