

1 Einleitung

Pflanzen, die sich selbst an unerwünschten Stellen ansiedeln, werden allgemein als „Unkräuter“ bezeichnet. Wenn sie in der Landwirtschaft zwischen Kulturpflanzen wachsen und gedeihen führt dies zu erheblichen Problemen, da sie mit diesen in Konkurrenz um Nährstoffe, Wasser und Licht stehen. Zusätzlich können Unkräuter Schäden verursachen, indem sie als Nahrungsgrundlage für Ungeziefer und Krankheiten dienen, den Erntevorgang erschweren und die Kosten für Reinigung und Trocknung des Ernteguts in die Höhe treiben. Aus diesen Gründen ist eine gut abgestimmte Unkrautkontrolle für eine effiziente und rentable Landwirtschaft unerlässlich. Durch die Einführung der chemischen Unkrautbekämpfung durch Herbizide, konnte die mit erheblichem Zeit- und Arbeitsaufwand verbundene manuelle und mechanische Unkrautbeseitigung, ersetzt werden.

Für die chemische Unkrautbekämpfung gibt es die so genannten Totalherbizide, die sowohl gegen Kulturpflanzen als auch gegen Unkräuter wirken, sofern sie über grüne Pflanzenteile aufgenommen werden (Peterson *et al.* 2001, Seitz *et al.* 2003). Diese lassen sich in Kontakt- und systemische Herbizide einteilen. Erstgenannte wirken auf dem besprühten Bereich und sind normalerweise schnell wirksam und regenfest. Systemische Herbizide wandern in der Pflanze vom Ort der Aufnahme in Richtung der Vegetationspunkte, die dann zerstört werden. Daneben gibt es die so genannten selektiven Herbizide, welche direkt auf bestimmte Kulturpflanzen aufgebracht werden können, ohne diese zu schädigen, gleichzeitig aber eine wirksame Unkrautkontrolle bieten. Totalherbizide sind nur begrenzt einsetzbar. Um dies zu umgehen, kann man herbizidtolerante Kultursorten auf konventionellem Wege oder auch mit Mitteln der Gentechnik züchten. Ein Beispiel für einen traditionellen Züchtungsansatz ist das Clearfield® Produktionssystem (BASF). Ind Clearfield® Kulturpflanzen wurde, durch induzierte Mutagenese, Resistenz gegenüber Herbiziden auf der Basis von Imidazolinonen erzeugt. Das Target dieser Herbizide ist die Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS). Die Clearfield® Kulturpflanzen tragen eine Punktmutation im entsprechenden *A/s*-Gen. Dies führt zu einer Aminosäure Substitution im exprimierten AHAS Enzym. Die Veränderung dieser einzelnen Aminosäure verändert die Bindungsstelle der AHAS für die Imidazolinone, hat jedoch keinen Effekt auf die normale Funktion des Enzyms. Da der Herbizidwirkstoff nicht mehr an die AHAS binden kann, werden die Clearfield Pflanzen durch das Herbizid nicht geschädigt. Verfügbar sind Clearfield-Saatgutlinien für Weizen, Reis, Sonnenblumen und Raps. Daneben wird auch die Gentechnik eingesetzt, um Gene, welche die Herbizidtoleranz vermitteln, künstlich in die Kulturpflanzen übertragen. Die so veränderte Kulturpflanze

wird zusammen mit dem passenden Herbizid vermarktet. Prominente Beispiele sind LibertyLink® von Bayer CropScience und Roundup Ready® von Monsanto. Der Wirkstoff von Roundup, Glyphosat, hemmt ein pflanzliches Stoffwechsellenzym, die EPSP-Synthase. Dieses Enzym ist für die Herstellung lebenswichtiger aromatischer Aminosäuren der Pflanze unentbehrlich. Mit Hilfe der Gentechnologie wurde Mais-, Soja- und Baumwollsaatgut erzeugt, welches gegen Roundup resistent ist (Roundup Ready® - Saatgut). Diese Pflanzen enthalten ein zusätzliches EPSPS-Enzym, aus dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*, welches durch Glyphosat nicht gehemmt wird. Im Falle des LibertyLink® Systems, exprimieren die Kulturpflanzen eine Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (PAT) aus *Streptomyces viridochromogenes*. Dieses Enzym kann Glufosinat, den Wirkstoff des Herbizides Liberty, acetylieren und damit unwirksam machen. Ein Beispiel hierfür ist InVigor/LibertyLink® (Raps). Die klassische Züchtung herbizidresistenter Kulturpflanzen ist extrem zeitaufwändig und die Akzeptanz gegenüber gentechnisch veränderten Kulturpflanzen ist gering.

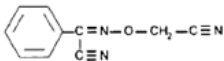
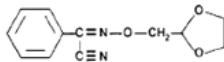
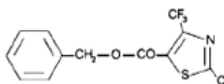
Neben Totalherbiziden gibt es selektive Herbizide, die zur Unkrautkontrolle eingesetzt werden können, ohne dass sie die Kulturpflanze schädigen. Beispiele hierfür sind die Herbizide s-Triazine (z.B. Atrazin) und 2,4-D. Triazine werden in verschiedenen Kulturen, hauptsächlich in Mais, zur Kontrolle breitblättriger Unkräuter eingesetzt. In Deutschland besteht seit 1992 jedoch ein vollständiges Anwendungsverbot von Atrazin. Als selektives Herbizid wirkt 2,4-D gegenüber den Dikotyledonen und wird beispielsweise im Mais- und Reisanbau, im Weinbau als auch in Zuckerrohrplantagen eingesetzt. Die Kulturpflanze besitzt hierbei eine natürliche Resistenz gegenüber dem Herbizid. Eine Möglichkeit für diese Resistenz ist, dass der Angriffsort des Herbizides nur in den Unkräutern vorhanden ist. Ein zweiter Resistenzmechanismus beruht auf einer veränderten Absorption/Translokation oder einer schnelleren Metabolisierung des Herbizids in der Kulturpflanze, verglichen mit dem Unkraut. Die Entwicklung selektiver Herbizide ist schwierig und mit einem hohen Kostenaufwand verbunden.

Eine weitere Möglichkeit, Selektivität in Kulturpflanzen zu erzeugen, bietet die Safener-Technologie. Safener sind chemische Substanzen, die bereits bekannten nicht selektiven Herbiziden, beigemischt werden. Safener induzieren eine Toleranz in den Anbaupflanzen, ohne dabei die Wirksamkeit der Herbizide gegen die Zielunkräuter zu verringern. Kulturpflanzen und Unkräuter gehören teilweise zur gleichen botanischen Familie und haben ähnliche physiologische Eigenschaften. Safener führen jedoch nur in der Kulturpflanze zu einer veränderten Absorption/Translokation und Metabolisierung des Herbizids. Der Einsatz der Herbizid-Safener-Kombinationen ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Diese Kombinationen werden in vielen

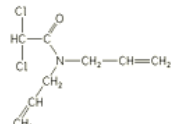

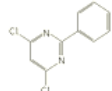
Kulturen, die normalerweise nicht ausreichend tolerant gegenüber den angewendeten Pestiziden sind, eingesetzt. Von besonderem Interesse ist dabei die Verwendung in monokotylen Kulturen wie Getreide (Weizen, Gerste, Roggen, Triticale, Sorghum), Mais und Reis. Safener für dikotyle Pflanzen konnten bislang nicht gefunden werden. Jedes Jahr werden tausende Verbindungen in einem Hochdurchsatz-Screening auf eine mögliche Anwendung als Zusatz in Herbiziden getestet.

1.1 Herbizid Safener

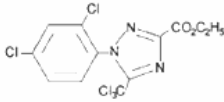
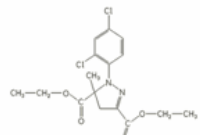
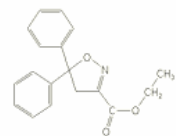
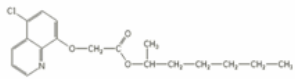
Safener sind synthetische Verbindungen die die Herbizidtoleranz in einigen monokotylen Kulturpflanzen erhöhen ohne die Empfindlichkeit der Zielunkräuter zu beeinflussen (Davies *et al.* 1999). Safener führen zu Selektivität eines Herbizides bzw. können die Selektivität erhöhen. Das Phänomen des „Safening“ wurde 1947 von Otto Hoffman entdeckt. Durch ein Versehen wurden zuvor mit dem Herbizid 2,4,5-T (2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure) behandelte Pflanzen zusätzlich Dämpfen des Herbizides 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) ausgesetzt. Diese Pflanzen zeigten jedoch keine Herbizidsymptome (Hoffman 1953). Nach der Entdeckung von Hoffman wurden durch Screeningprogramme andere Verbindungen mit Safening-Effekt gefunden. Dies führte schließlich zur Einführung von Naphtalinsäure-Anhydrid (1,8-Naphthalindicarbonsäureanhydrid) als dem ersten kommerziellen Safener 1971. Dieser wurde zusammen mit Thiocarbamatherbiziden in Getreidepflanzen (Mais, *Zea mays* L.) eingesetzt (Hoffman 1969, Hoffman 1978). Seit 2000 ist Husar® das erste Herbizid mit Safenertechnologie in Deutschland. Hierbei kommt eine Kombination des Herbizids Iodosulfuron-methyl-natrium mit dem Safener Mefenpyr-diethyl zum Einsatz. Der Safener Fenclorim wurde gegen das Herbizid Petilachlor in Reis (*Oryza sativa* L.) eingeführt (Hatzios, 1993). Benoxacor schützt Mais vor Chloroacetanilid Herbiziden (wie Metolachlor und Alachlor). Safener haben jedoch keinen schützenden Effekt auf dikotyle Unkräuter (Irzyk *et al.* 1993). Kommerziell erhältliche Safener, ihre Applikationsmethode, die entsprechenden Herbizide und der Einsatz in den verschiedenen Kulturen sind im Folgenden dargestellt.

a) Saatgut-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Cyometrinil 	Hirse	Thiocarbamate, Chloracetamide
Oxabetrinil 	Hirse	Thiocarbamate, Chloracetamide
Flurazol 	Hirse	Chloracetamide

Saatgut-Safener: Beizung des Saatguts und separate Behandlung mit dem Herbizid

b) Boden-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Dichlormid 	Mais	Thiocarbamate, Chloracetamide
Benoxacor 	Mais	Thiocarbamate, Chloracetamide
Fenclorim 	Reis	Pretilachlor

Boden-Safener: Einsatz im Voraufbau zusammen mit dem Herbizid

c) Blatt-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Fenclorazol-ethyl 	Getreide	Fenoxaprop-ethyl
Mefenpyr-diethyl 	Getreide	ACCCase und Sulfonyharnstoffe
Isoxadifen-ethyl 	Mais, Reis	ACCCase und Sulfonyharnstoffe
Cloquintocet-mexyl 	Weizen	Clodinafop- propagyl

Blatt-Safener: Einsatz im Nachaufbau zusammen mit dem Herbizid

Beispiele für Thiocarbamatherbizide sind EPTC und Butylat. Zu den Chloracetamidherbiziden gehören beispielsweise Metolachlor und Alachlor. Fenoxaprop-P-Ethyl ist ein ACCase-hemmendes Herbizid. Zu den Sulfonylharnstoffherbiziden werden Iodosulfuron-methyl-natrium und Mesosulfuron-methyl gezählt.

Herbizidklassen, welche in Kombination mit Safenern verwendet werden können, sind Aryloxyphenoxypropionate, Sulphonylharnstoffe, Imidazolinone, Isoxazolinone und Cyclohexadione (Davies 2001). Ein einziger Safener kann in Kombination mit Herbiziden unterschiedlicher chemischer Struktur und Wirkmechanismen verwendet werden. Zum Beispiel schützen Dichloracetamidsafener Mais gegen Chloroacetanilid- und Thiocarbamat Herbizide (Scott-Craig *et al.* 1998). Obwohl Safener in dikotylen Spezies ähnliche Effekte haben wie in Monokotylen (s. 1.1.1), wurden bisher keine kommerziell erhältlichen Safener für dikotyle Nutzpflanzen gefunden. Die Selektivität der Safener für monokotyle Pflanzen wurde mit einem noch uncharakterisierten agronomisch verwendbarem Merkmal in Verbindung gebracht, welches durch Züchtung selektiert wurde (Edwards *et al.* 2005c).

1.1.1 Der Safener Wirkmechanismus

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze zu der Wirkungsweise von Safenern. Es wäre möglich, dass Safener zu einer veränderten Herbizidaufnahmerate in Kulturpflanzen führen, und somit die Pflanzen vor einer zu hohen und schädigenden Herbiziddosis schützen. Es gibt verschiedene Studien die sich mit dieser Theorie beschäftigt haben, jedoch wurden unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Safener bzw. Herbizide erhalten (Ekler *et al.* 1993, Ezra *et al.* 1982). Dies spricht dafür, dass eine Variation der Aufnahmerate nicht der einzige Effekt, bzw. nicht der allgemeine Effekt von Safenern sein kann. Ein kompetitiver Antagonismus, zwischen Herbizid und den strukturell oft herbizidähnlichen Safenern, wäre ein weiterer denkbarer Wirkmechanismus (Bordás *et al.* 2002, Scott-Craig *et al.* 1998, Walton and Casida 1995). Es war möglich bekannte Herbizid-Rezeptoren zu isolieren und auf einen kompetitiven Antagonismus zwischen Safener und Herbizid zu untersuchen. In manchen Fällen wurde durch Safener die Herbizid-Rezeptor-Interaktion nicht beeinflusst (Polge *et al.* 1987, Köcher *et al.* 1989, Hatzios 1991). Walton und Casida (1995) konnten jedoch die Bindung eines Dichloracetamid-Safeners an das SafBP Mais-Protein nachweisen. Dies führte zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung des SafBP-Proteins durch Metolachlor und EPTC. Auch eine antagonistische Wirkungsweise scheint somit nicht immer für die

Safenerwirkung ausschlaggebend zu sein. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer durch Safener induzierten Translokation der Herbizide in Zellkompartimente, in denen sie keine schädliche Wirkung mehr entfalten können (Ezra *et al.* 1982, Ketchersid *et al.* 1982, Fuerst 1987, Varvina 1987, Fuerst *et al.* 1991). Der jedoch am häufigsten untersuchte, und weitestgehend akzeptierte Mechanismus der Safenerwirkung, beruht auf einem durch die Safener veränderten Herbizidmetabolismus (Fürst *et al.* 1991, Sagral 1978, Zama and Hatzios 1986, Gronwald 1989, Tal *et al.* 1993, Burton *et al.* 1994).

Die Detoxifizierung von Herbiziden und anderen Xenobiotika erfolgt in Pflanzen in vier Phasen (s. Abb. 1-1; Coleman *et al.* 1997, Kreuz *et al.* 1996, Davies and Caseley 1999).

Phase I

In der ersten Phase wird das Herbizid durch die Einführung oder Abspaltung von funktionellen Gruppen (meist durch Oxidation oder Hydrolyse) aktiviert. Diese Reaktionen werden von Enzymen wie Esterasen, Amidasen und häufig Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen katalysiert. Einige Herbizide können Phase I jedoch überspringen, da sie schon an sich reaktiv sind (Coleman *et al.* 1997).

Phase II

Diese reaktiven Gruppen ermöglichen die Konjugation in Phase II mit endogenen Verbindungen wie Glutathion (GSH), Glucose oder Malonat. Diese Konjugation führt zur Bildung eines wasserlöslichen Produkts, welches normalerweise weniger toxisch und mobil ist als das ursprüngliche Herbizid. Die Konjugationen werden von den entsprechenden Glutathion-, Glucosyl- oder Malonyl-transferasen katalysiert.

Phase III

Mit Hilfe von ATP-abhängigen Transportern erfolgt in Phase III die Translokation der Konjugate aus dem Zytosol in die Vakuole oder den Apoplast, was eine mögliche Feedback-Hemmung der Transferasen vermeidet. Zu den Transportern, welche die Translokation von Glutathionkonjugaten katalysieren, zählen „multidrug resistance-associated“ Proteine (MRP), die zur ABC Superfamilie der Transporter gehören. ABC Transporter sind jedoch nicht in jedem Fall beteiligt, es gibt auch Transporter die vom transmembranen H^+ Gradienten abhängig sind (Lamoureux and Rusness, 1981).