

Der Anbau von Pflanzen, insbesondere Dioscoreen zur Steroidgewinnung

The cultivation of plants, especially *Dioscorea* species, for steroid production

Von Christian Bruhn, Wolfgang Koch und Oskar Schmidt^{o)}

1. Einleitung

Steroidhormone als Geschlechtshormone zur Behebung von Störungen des Hormonhaushaltes bei Frau und Mann und zur Schwangerschaftsverhütung sowie Corticoide zur Behandlung von Herz- und Gefäßkrankungen und Entzündungen sind heute häufig verwendete Arzneimittel. Ihre Entwicklung und Verbreitung wurde dadurch ermöglicht, daß es gelang, die seltenen und teuren tierischen Ausgangsprodukte für ihre Gewinnung durch häufigere und billigere pflanzlichen Ursprungs zu ersetzen. Steroide kommen in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben vor, jedoch meist in sehr geringer Menge und oft mit einer für den Aufbau der gewünschten Verbindung ungünstigen Struktur.

Als in den 40er Jahren die medizinische Bedeutung der damals noch nicht lange bekannten Corticoide und Steroidhormone erkannt wurde, begann sofort die Suche nach ausreichenden Rohstoffquellen, denn die Möglichkeiten, sie aus Schlachthofabfällen zu gewinnen, sind sehr begrenzt. 1950 begann das United States Department of Agriculture mit weltweiten Expeditionen zur Suche nach steroidhaltigen Pflanzen, die zur Entdeckung verschiedener praktisch brauchbarer Arten führten (1).

^{o)} Dr. Christian Bruhn, Diplomgärtner, Schering A. G. Berlin.

Anschrift: 1 Berlin 65, Müllerstraße 170—172.

Dr. Wolfgang Koch, Biologe, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig.

Anschrift: 33 Braunschweig, Messeweg 11/12.

Dr. Oskar Schmidt, Diplomgärtner, Isar-Rakoll Chemie GmbH.

Anschrift: 8 München 90, Ständlerstr. 45.

2. Pflanzen zur Steroidgewinnung

Afrikanische *Strophantus*-Arten, deren Samen *Sarmentogenin* enthalten, gehörten zu den ersten Pflanzen, mit denen man sich intensiv beschäftigte. Sie traten jedoch bald wieder in den Hintergrund, als man andere Pflanzen fand, die wesentlich größere Mengen geeigneter Steroide nicht allein in den Samen enthalten.

Unter den monocotylen Pflanzen enthalten verschiedene *Agaven*arten und vor allem zahlreiche *Dioscoreen* größere Mengen geeigneter Steroide. — Unter den Dicotylen spielt die Soyabohne, *Glycine soya*, eine große Rolle als Steroidlieferant. Sie enthält *Stigmasterin*, welches bei der Verarbeitung als Nebenprodukt anfällt. Ende der 50er Jahre publizierten russische Autoren über die Verwendung von *Solanum*-Arten zur Steroidgewinnung, so daß hiermit auch im Westen Versuche angestellt wurden, die aber offensichtlich nicht zu praktisch verwertbaren Ergebnissen führten. Ob in der UdSSR, wo wegen des gemäßigten Klimas keine ergiebigen *Dioscoreen* vorkommen oder kultiviert werden können, tatsächlich *Solanaceen* zur Steroidgewinnung angebaut werden, entzieht sich unserer Kenntnis. Die Erträge dürften auf jeden Fall wesentlich geringer sein, als bei den *Dioscoreen*.

Schließlich bilden auch viele Mikroorganismen Steroide, besonders *Ergosterin*. Am ergiebigsten sind bestimmte Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae*. Aber selbst unter optimalen Bedingungen konnte bisher die mikrobiologische *Ergosterin*produktion nicht mit dem *Diosgenin* aus den *Dioscoreen* konkurrieren. Die Kalkulationen für ein mikrobiologisches Verfahren fallen eben ganz unterschiedlich aus, je nachdem ob man einen hochwertigen Wirkstoff, z. B. ein Antibiotikum oder Enzym gewinnt, oder einen noch viele Stufen weiter zu verarbeitenden Rohstoff, wie das *Ergosterin*. Aus dem gleichen Grunde haben auch Versuche, höhere Pflanzen, die Steroide enthalten, in Gewebekultur zu züchten (2,3) nicht zu praktisch verwertbaren Ergebnissen geführt. — Am Rande wäre noch zu bemerken, daß es auch mikroskopische Pilze gibt, die interessante Bakterizide und Fungizide mit Steroidstruktur bilden, wie

Fusicoccum tingens: *Fucidin*

Trichoderma viride: *Viridin*

Cephalosporium spec.: manche *Cephalosporine*.

Als praktisch interessante Rohstoffquellen blieben also zunächst nur die *Agaven* und die *Dioscoreen*. Die Verwertung der *Agaven*steroide ist bisher offenbar nicht über Versuche hinausgekommen, obwohl diese Pflanzen zur Fasergewinnung in verschiedenen Gebieten der Erde angebaut bzw. gesammelt werden und man eigentlich nur die dabei anfallenden Abfälle aufzuarbeiten braucht. So wird *Agave sisalana*, die *Hecogenin* enthält, z. B. auf Yucatan in Mexiko in großen Plantagen angebaut. Die Blätter werden

auf den Farmen zu Fasern verarbeitet. Dabei fallen feste und flüssige Abfälle an, die *Hecogenin* enthalten. Eine kleinere Art, *Agave lechuguilla*, die hauptsächlich *Smilagenin* enthält, wächst im Norden Mexikos und den angrenzenden Teilen der USA wild. Sie wird in Mexico von den Bewohnern gesammelt, in Heimarbeit zu Fasern verarbeitet, und diese werden dann an ein staatliches Handelsunternehmen verkauft. Das *Smilagenin* bleibt in den häuslichen Abfallhaufen.

3. Dioscoreenanbau

Große praktische Bedeutung haben die *Dioscoreen* erlangt. Das sind Lianen, die in den warmen Zonen der Erde verbreitet sind. Sie enthalten in ihren sehr eigenartigen, mehrjährigen Knollen (4) bis ca. 2 % brauchbare Steroide, hauptsächlich *Diosgenin*, bezogen auf das Frischgewicht. In den 50er Jahren begann die Ausbeutung dieser natürlichen Rohstoffquellen, durch die interessierten Firmen, und man machte sich auch schon bald darüber Gedanken, was man nach der Erschöpfung der sicher begrenzten Vorräte tun könnte. So ergab es sich, daß fast alle Interessenten mehr oder weniger gründliche und langdauernde Anbauversuche durchgeführt haben, z. B. die Firmen Ciba in Costa Rica, Forestal Lands, Timber and Railway Co. in Kenia, Merck and Co. in Guatemala, Schering A. G. in Guatemala, Syntex in Mexiko, Upjohn in Guatemala und das United States Department of Agriculture in Florida und Puerto Rico.

Ausführliche Publikationen über diese Anbauversuche gibt es nur vom USDA, z. T. sogar mit recht detaillierten Kosten- und Gewinnabschätzungen (5). Dabei muß man jedoch berücksichtigen, daß es sich immer um verhältnismäßig kleine und entsprechend leicht zu pflegende und überwachende Flächen handelte, und daß die damit angestellten Hochrechnungen oft sehr problematisch sind. Die beschriebenen Methoden stimmen jedoch mit den von verschiedenen Industriefirmen erarbeiteten weitgehend überein.

Die meisten Versuche sind mit den mittelamerikanischen Arten *D. composita* und *D. spiculiflora* durchgeführt worden, wovon *D. comp.* die kräftigere ist, dafür aber im Durchschnitt einen niedrigeren *Diosgenin*gehalt hat. Die *Dioscoreen* gehören zu den einkeimblättrigen Pflanzen, was man ihnen jedoch zunächst gar nicht ansieht. Sie sind Schlingpflanzen, deren Laub und Wuchsform stark an Stangenbohnen erinnert (Abb. 1). Sie haben jedoch unscheinbare, fast grasartige Blüten in großen Blütenständen und pfenniggroße, hauchdünne Flugsamen. Sie sind zweihäusig und windblütig. Die uns interessierenden Arten haben außerdem unterirdische, ausdauernde Hypokotylknollen mit sekundärem Dickenwachstum, eine im Pflanzenreich einmalige Bildung (4): Diese Knollen können bis zu einem Zentner schwer werden, sind fast handförmig verzweigt (Abb. 2) und enthalten die begehrten Steroide, von denen das *Diosgenin* das häufigste und interessanteste ist. Die Steroide sind in den Knollen als *Saponine* enthalten,

und diese werden deshalb unter dem Namen *Barbasco* als Fischgifte verwendet. Verschiedene steroidfreie Arten werden in den Tropen seit langem als Kulturpflanzen angebaut und dienen als Kartoffelersatz. Man darf sie jedoch nicht mit der Süßkartoffel *Ipomoea batatas* verwechseln, die zu den Windengewächsen gehört.



Abb. 1. Mehrjährige Pflanze von *Dioscorea composita*.

Für den Grobanbau der Dioscoreen muß man von Samen ausgehen. Die Vermehrung durch Knollenteilung, Stecklinge oder Blattstecklinge ist zwar möglich, jedoch nur in Spezialfällen praktikabel. Die Beschaffung der für einen Grobanbau erforderlichen Samenmengen ist schwierig, zumal die Samen der brauchbaren Arten oft mit denen unbrauchbarer verunreinigt sind, und sich schwer von diesen unterscheiden lassen. Im tropischen Klima verlieren die Samen außerdem verhältnismäßig schnell ihre Keimfähigkeit.

Man sät zu Beginn der Regenzeit. Für ein Beet von 45 qm (1,5 m breit und 30 m lang) benötigt man etwa 300 g Samen, das sind über 30 000 Stück. Die Samen keimen erst nach 3—4 Wochen und die Sämlinge wach-

sen in der ersten Zeit sehr langsam. Die Aussaatbeete müssen deshalb sehr sorgfältig vorbereitet werden. Sie müssen frei von Unkrautsamen, tierischen Schädlingen wie Nematoden, Insektenlarven und phytopathogenen Pilzen sein. Es gibt heute Präparate, z. B. auf der Basis von *Methyl-iso-thiocyanat*, mit denen man den Boden für solche Zwecke weitgehend entseuchen kann. Die Sämlinge müssen beschattet, sehr gleichmäßig bewässert werden, und benötigen, da sie bald zu ranken anfangen, eine geeignete Stütze, z. B. Maschendraht.

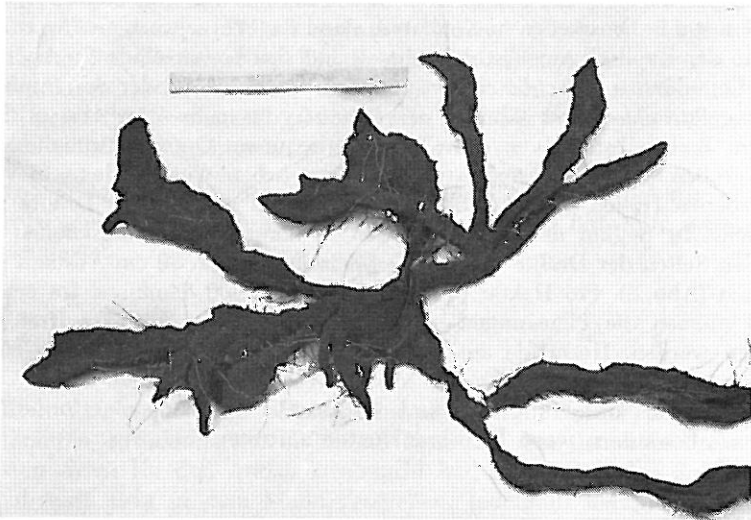


Abb. 2. Flachwachsende, mehrjährige Knolle von *Dioscorea floribunda*.

Zur Verhütung einer durch ein *Helminthosporium* hervorgerufenen Blattfleckenkrankheit (6) sind in Guatemala regelmäßig preventive Fungizidspritzungen erforderlich. Sind die Beete nicht ordnungsgemäß entseucht, so werden die Sämlingswurzeln und Knollen stark von Wurzelgallennematoden: *Meloidogyne incognita*, befallen und vernichtet (7, 8). Obwohl sich die Sämlinge für kleinere Versuche schon nach 6 Monaten verpflanzen lassen, muß man sie für den Feldanbau etwa 1 Jahr im Sämlingsbeet lassen, zumal sich auch die tropische Landwirtschaft nach dem jahreszeitlichen Rhythmus des Klimas (Regenzeit—Trockenzeit) und der Pflanzen richten muß.

Der Feldanbau ist im tropischen Klima, also im Verbreitungsgebiet von Zuckerrohr und Banane möglich. Die Regenzeit soll mindestens 7 Monate betragen. Je gleichmäßiger die Regenfälle über das Jahr verteilt sind, um so höhere Erträge kann man erwarten. Da man die Knollen zum Schluß ausgraben muß, soll der Boden nicht zu schwer, möglichst tiefgründig und

steinfrei sein. Wie bei anderen Wildpflanzen führt Düngung nicht unbedingt zu einer Ertragssteigerung. Wenn die Knollen dadurch wirklich größer werden, kann man damit rechnen, daß der Steroidgehalt dafür sinkt. Sehr wichtig bei der Feldpflanzung ist die Unterstützung der rankenden Triebe, und sie macht den Anbau besonders kostspielig. Tote Holzstäbe werden nämlich in den Tropen in kurzer Zeit von Termiten aufgefressen. Metall- oder Betonpfosten werden für einen großflächigen Anbau sehr teuer. Auch Kunststoffe werden in den Tropen durch die intensive Sonnenbestrahlung recht schnell zerstört. Die einzige Lösung sind deshalb „lebende“ Pfosten mit Draht. Aber selbst die günstigsten Pflanzen treten stark mit den *Dioscoreen* in Konkurrenz und ihr Wurzelwerk erschwert die Ernte der Knollen. Am besten geeignet sind sich bewurzelnde Stechhölzer der Leguminose *Gliricidia sepium* (ähnlich der *Robinie*) oder der *Euphorbiacee* *Jatropha curcas* (ähnlich der *Ricinus*), die in 3—7 m Abstand bei einem Reihenabstand von etwa 2,50 m (bequeme Durchfahrtmöglichkeit für großen Traktor) gesteckt werden. Dazwischen werden dann in verschiedenen Höhen, z. B. 30, 60, 90 und 120 cm waagerechte Drähte gespannt. Zu Beginn der Regenzeit werden dann die Sämlingsknollen zu beiden Seiten der Drähte in einer Doppelreihe mit ca. 30 cm Abstand gepflanzt (Abb. 3). Pro Hektar pflanzt man 50—60 000 Sämlinge. Im ersten Jahr müssen die Pflanzungen mechanisch oder chemisch unkrautfrei gehalten werden. Herbizide auf der Basis von 2,4-Bis-(äthylamino)-6-chlor-1,3,5-triazin werden von den *Dioscoreen* recht gut vertragen. Unter Umständen sind auch fungizide und insektizide Spritzungen erforderlich, letztere besonders, wenn Viruskrankheiten auftreten (5).

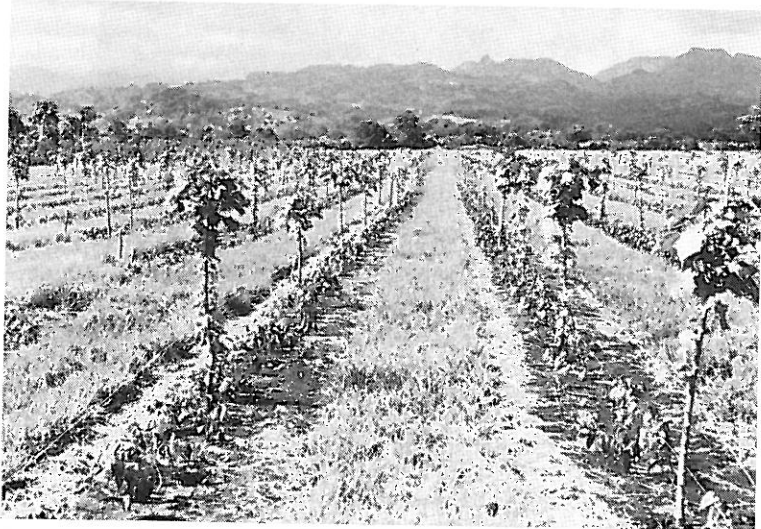


Abb. 3. Drei Monate alte Feldpflanzung von *Dioscorea composita*.

Die Knollen können frühestens nach 3 Jahren geerntet werden. Da eine maschinelle Ernte der stark verzweigten und z. T. bis 70 cm in den Boden hineingewachsenen Knollen praktisch unmöglich ist, müssen sie meist von Hand ausgegraben werden, eine Arbeit, die auch in den Entwicklungsländern immer teurer wird. Erntet man nun 40 000 Knollen (ein Verlust von mindestens 20 % durch Nichtanwachsen und spätere Schäden ist bei großflächigem Anbau nach unseren Erfahrungen kaum zu vermeiden) mit einem Durchschnittsgewicht von 1 kg und einem durchschnittlichen Diosgeningehalt von 1 % bezogen auf das Frischgewicht (das entspricht etwa 5 % bezogen auf das Trockengewicht), so ergibt das eine Ausbeute von 400 kg Diosgenin pro Hektar nach drei Jahren Feldkultur und einem Jahr Vorkultur im Sämlingsbeet. Die Kosten dafür liegen nach verschiedenen Schätzungen zwischen 1000 und 4000 US \$/ha. Diese Ausbeute von 400 kg/ha dürfte nur mit großen Anstrengungen und bei ständiger Anwesenheit eines Fachmanns zu erreichen sein.

Die Schwierigkeiten des *Dioscoreen*anbaus sind also erheblich, und er wird sich nur dann durchsetzen, wenn die natürlichen Rohstoffe sich weiter verknappen.

4. Solanaceenbau

Zum Vergleich wollen wir noch einmal auf die *Solanaceen* als Steroidlieferanten zurückkommen. Während man sich bei den *Dioscoreen* die besten Arten für den Anbau ausgesucht hat, ist das bei den *Solanaceen* wohl noch nicht in dem Maße geschehen. Jedenfalls liefern europäische Arten wie *Solanum dulcamara* nur einen verhältnismäßig geringen Blattertrag. Subtropische Arten wie *S. aviculare* oder das nahe verwandte tetraploide *S. laciniatum* liefern wesentlich mehr Masse. Auch *S. sodomaeum* ist recht produktiv, wegen seiner Stacheln aber sehr schwer zu ernten und zu verarbeiten. — In den Tropen, z. B. in Guatemala, gibt es viele z. T. recht schnell- und starkwüchsige und wahrscheinlich auch *solasodin*haltige Arten, mit denen man sich unseres Wissens überhaupt noch nicht beschäftigt hat. — Bei *S. aviculare* braucht man etwa 2 Monate für die Sämlingsanzucht. Stecklingsvermehrung ist möglich, kommt aber auch hier nur für Spezialfälle in Frage. Man pflanzt dann auf das Feld und kann noch im gleichen Jahr zweimal schneiden und maximal 60 Tonnen frisches Kraut pro Hektar ernten. Bei 80 % Wassergehalt und einem *Solasod*ingehalt von 0,5 % bezogen auf das Trockengewicht bekäme man dann 60 kg *Solasodin*/ha in einem Jahr oder 180 kg in 3 Jahren, also wesentlich weniger, als beim *Dioscoreen*anbau. Als weitere Erschwerung kommt die wesentlich größere Menge an frischem Pflanzenmaterial hinzu, die man bewegen muß, und der größere Bedarf an Lösungsmitteln für die Extraktion. Außerdem ist die Gefahr von Pilzkrankheiten sehr groß. *Phytophthora infestans* kann z. B. einen Feldbestand in wenigen Tagen vernichten.

5. Zucht und Auslese

Schließlich wäre noch kurz auf die Möglichkeit einzugehen, Steroidpflanzen, also *Dioscoreen* und *Solanaceen* durch Zucht und Auslese zu verbessern. Bei den *Dioscoreen* sind Tausende von Wildpflanzen gesammelt, einzeln analysiert, Knollenteile davon weiterkultiviert und nach mehreren Jahren erneut analysiert worden. Die Korrelationen waren sehr gering. Bei unseren Kulturpflanzen, die z. T. nur eine Generationsdauer von einem Jahr haben, hat die Entwicklung leistungsfähiger Sorten trotzdem Jahrtausende gedauert. Man kann also nicht erwarten, bei *Dioscoreen* mit einer Generationsdauer von 4 Jahren in kurzer Zeit zum Ziel zu kommen. — Bei den *Solanaceen* würden wir eine mindestens genauso große Streuung des Steroidgehalts verschiedener Pflanzen und ihrer Nachkommen erwarten.

6. Zusammenfassung

Der Einsatz der Steroidhormone und Corticoide in der Humanmedizin wurde erst möglich, als es gelang, die seltenen und teuren tierischen Ausgangsprodukte durch häufiger vorkommende und billigere Ausgangsprodukte pflanzlichen Ursprungs zu ersetzen. Von den Pflanzenarten, die sich zur Steroidgewinnung eignen, haben vor allem die *Dioscoreen* große praktische Bedeutung erlangt. Während zunächst nur Wildbestände genutzt bzw. ausgebeutet wurden, hat die einschlägige Industrie schon bald Versuche angelegt, mit dem Ziel der Entwicklung geeigneter Anbau- und Zuchtmethoden. Über erste Erfahrungen im Feldanbau wird in der vorliegenden Arbeit berichtet. Da die *Dioscoreen* Pflanzen der warmen Klimate sind, ist es verständlich, daß man in Ländern, die nicht über die erforderlichen klimatischen Anbaubedingungen verfügen, nach anderen, den jeweiligen klimatischen Verhältnissen besser angepaßten Pflanzen gesucht hat. Hier bieten sich verschiedene *Solanaceen* an, die jedoch im Vergleich zu den *Dioscoreen* im Ertrag nicht befriedigen.

Summary

The large scale production of the many useful steroid hormones and corticoids was only possible through the discovery of useful precursors in wild and cultivated plants. The most important families are the *Amaryllidaceae* with *Agave rigida* (*A. sisalana*) and *A. lechuguilla*, the *Dioscoreaceae* with *Dioscorea composita* and *D. floribunda*, the *Leguminosae* with *Glycine soya* (soybean) and the *Solanaceae* with *Solanum aviculare* and *S. laciniatum*. The *stigmasterin* of the soybean can be obtained as a by-product in soybeanprocessing. *Smilagenin* and *hecogenin* could be obtained in the same way in the fiber production from the respective *Agave* species.

The *Dioscorea* species, containing *diosgenin* can be cultivated commercially only for their steroid content which is relatively high. But the cultivation takes several years, is only possible in the tropics and rather difficult.

Literatur

1. CORRELL, D. S., B. G. SCHUBERT, H. S. GENTRY and W. O. HAWLEY, 1955: The search for plant precursors of cortisone. — *Economic Botany* 9, 307—375.
2. GRABOW, U.: Über die Gewinnung von Gewebekulturen von *Dioscorea composita* Hemsl. und *Solanum laciniatum* Ait. (Syn. *aviculare* Forst.) und Untersuchung des Steroid-Gehalts in intakten Pflanzen und im Kallus.
3. MERCK, E.: Verfahren zur Züchtung von differenziertem Wurzelgewebe. — DOS 1 216 009.
4. KOCH, W. und Chr. BRUHN, 1962: Über die Morphologie der Speicherorgane einiger mittelamerikanischer Dioscoreen. — *Flora* 152, 670—678.
5. MARTIN, F. W. and M. H. GASKINS, 1968: Cultivation of the sapogenin-bearing *Dioscorea* species. — Production Research Report No. 103, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, September 1968.
6. KOCH, W., 1964: Helminthosporium leafspot of *Dioscorea* in Guatemala. — *Phytopathology* 54, 365—366.
7. BRUHN, Chr. und W. KOCH, 1962: Beobachtungen über den Befall mittelamerikanischer Dioscoreenarten durch *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White). — *Nematologica* 8, 307—312.
8. BRUHN, Chr. und W. KOCH, 1963: Control of root-knot nematodes on *Dioscorea* tubers. — *Phytopathology* 53, 24.