

# Induktion des Sekundärmetabolismus in Tomatenpflanzen zur alternativen Verwendung der Blattbiomasse

Laura Verena Junker, Björn Thiele, Anika Wiese-Klinkenberg

DGG-Proceedings, Vol. 7, 2017, No. 10, p. 1-5  
DOI: 10.5288/dgg-pr-lj-2017

Corresponding Author:  
Laura Verena Junker, PhD  
Institut für Bio- und Geowissenschaften  
IBG-2: Institut für Pflanzenwissenschaften  
Forschungszentrum Jülich  
Wilhelm-Johnen-Str.  
52428 Jülich  
Germany  
Email: L.Junker@fz-juelich.de

## **Induktion des Sekundärmetabolismus in Tomatenpflanzen zur alternativen Verwendung der Blattbiomasse**

Laura Verena Junker, Björn Thiele, Anika Wiese-Klinkenberg

Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-2: Institut für Pflanzenwissenschaften,  
Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany

### **1. Einleitung, Stand des Wissens, Zielsetzung**

Die Blätter vieler Nutzpflanzen, insbesondere Nachtschattengewächse, enthalten wertvolle Sekundärmetabolite, die industriell genutzt werden könnten (Taylor und Fraser, 2011). Nichtsdestotrotz sind die Gehalte in Nutzpflanzen geringer als in den üblicherweise zu Ihrer Gewinnung angebauten Pflanzen (Oksman-Caldentey und Inzé, 2004). Eine erhöhte Biosynthese von Sekundärmetaboliten wird unter anderem durch abiotischen Stress induziert (Cramer et al., 2011; Ramakrishna und Ravishankar, 2011). Das interdisziplinäre BioSC-Projekt InducTomE untersucht das Potential, die Blattbiomasse von nach der Tomatenernte verbleibenden Pflanzen im Unterglasanbau durch gezielte Stressbehandlungen zur Gewinnung hochwertiger Sekundärmetaboliten zu nutzen. Dazu wird der Einfluss gezielter Stressbehandlungen auf den Sekundärmetabolitgehalt von unter kommerziellen Bedingungen angebauten Tomatenpflanzen untersucht und geeignete Extraktionsprozesse entwickelt, um zu evaluieren, ob der vorgeschlagene Wertschöpfungsprozess ökonomisch relevant gestaltet werden kann. Dadurch könnte ein Mehrwert beim gartenbaulichen Anbau von Nutzpflanzen generiert werden, ohne dass der Fruchtertrag beeinflusst wird.

Als Grundlage dieser Untersuchungen haben wir in Experimenten mit jungen Tomatenpflanzen unter kontrollierten Bedingungen untersucht, welche abiotischen Stressfaktoren die Akkumulation von Rutin und Solanesol induzieren. Rutin ist ein Flavonoid (Dixon und Steele, 1999), das in Pflanzen aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften oxidativen Stress reduziert (Suzuki et al., 2005), und aus diesem Grund auch als Nahrungsergänzungsmittel genutzt wird. Im Gegensatz dazu ist die Funktion des Isoprenoids Solanesol in der Pflanze noch nicht vollständig aufgeklärt (Yan et al., 2015). Es ist jedoch elementar für die Synthese von Coenzym Q<sub>10</sub> durch die Kosmetikindustrie und besonders hochpreisig (Machado et al., 2010; Taylor und Fraser, 2011). Wir gehen davon aus, dass Stickstoffmangel zu einer Induktion von Rutin und erhöhte Wachstumstemperaturen zu einer Induktion von Solanesol führen. Anhand siebentägiger Behandlungen mit unterschiedlichen Stressfaktoren untersuchen wir zudem, in welchem Ausmaß der Sekundärmetabolismus von Tomatenpflanzen angeregt werden kann.

## 2. Material und Methoden

Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum* 'Lyterno', Rijk Zwaan Welter GmbH, Deutschland) wurden hydroponisch in Steinwolle unter kontrollierten Bedingungen (22/18 °C Tag/Nachttemperatur, 50 % Luftfeuchte, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen Lichtintensität für 10 h pro Tag) unter großzügiger Bewässerung mit Hoagland-Nährlösung angezogen. In zwei Experimenten wurden einen Monat alte Pflanzen für eine Woche Stickstoffmangel (N, Auswaschen des Substrates und anschließende Bewässerung mit stickstofffreier Hoagland-Lösung), erhöhter Lichtintensität (HL, 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nächtlicher Kälte (°C, 20/12 °C Tag/Nachttemperatur), und Kombinationen dieser Stresse sowie erhöhte Tagestemperatur (e°C, 28/20 °C Tag/Nachttemperatur), auch in Kombination mit HL, ausgesetzt. Nach sieben Tagen wurde das viertälteste Blatt von je N=4 Pflanzen in Flüssigstickstoff eingefroren, gemörsert und bei -80 °C gelagert. Zur Berechnung der Trockenmasse (TM) wurden die dritt- und fünftältesten Blätter für drei Tage bei 80 °C getrocknet (TM liegt bei 9-14 % des Frischgewichts, mit höheren Werten für Stickstoffmangelpflanzen, was auf eine erhöhte Einlagerung von Stärke deutet).

30 mg des Probenmaterials wurden basierend auf den Methoden von Olsen et al. (2009) und Zhao et al. (2007) für 2 h in 1 ml Methanol extrahiert. Diese Methode erwies sich in vorherigen Untersuchungen als besonders effizient und zuverlässig (Junker et al., eingereicht). Der Gehalt an Rutin und Solanesol wurde mit einem Waters ACQUITY Ultrahochleistungsflüssigkeits-chromatografie (UPLC)-System (Waters Technologies Corp., MA, USA), gekoppelt mit einem Waters Xevo TQ-S Tripel-Quadrupol Massenspektrometer bestimmt. Nach Auftrennung der Extrakte mittels einer Aqua C<sub>18</sub>-Säule (150x2 mm, 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) wurden Rutin und Solanesol anhand externer Standards (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland; Glentham Life Sciences, Wiltshire, UK) quantifiziert. Die Induktion der Sekundärmetabolitgehalte in stressbehandelten Pflanzen wurde relativ zu den Kontrollpflanzen dargestellt und signifikante Unterschiede durch eine ANOVA mit anschließendem Tukey's Posthoc Test aufgezeigt.

## 3. Ergebnisse

In Experimenten mit jungen Tomatenpflanzen unter Stickstoffmangel, nächtlicher Kältebehandlung, erhöhter Lichtintensität sowie erhöhter Tagestemperatur konnten wir zeigen, dass eine Induktion der Zielmetabolite Rutin und Solanesol durch gezielte Stressbehandlungen unter kontrollierten Bedingungen möglich ist.

Der Gehalt des Flavonoides Rutin in den Blättern der Kontrollpflanzen betrug  $124 \pm 93 \text{ mg kg}^{-1}$  in der Trockenmasse (TM). Im Vergleich dazu zeigte sich eine deutliche Induktion unter Stickstoffmangel (Fig. 1). Eine maximale Induktion um den Faktor 6 wurde durch Stickstoffmangel in Kombination mit erhöhter Lichtintensität und nächtlicher Kältebehandlung erreicht. Bei weiteren Untersuchungen der Blattproben zeigten sich zudem erhöhte Expressionslevel von Genen des Flavonoidstoffwechsels sowie erhöhte Anthocyangehalte (Daten nicht gezeigt).

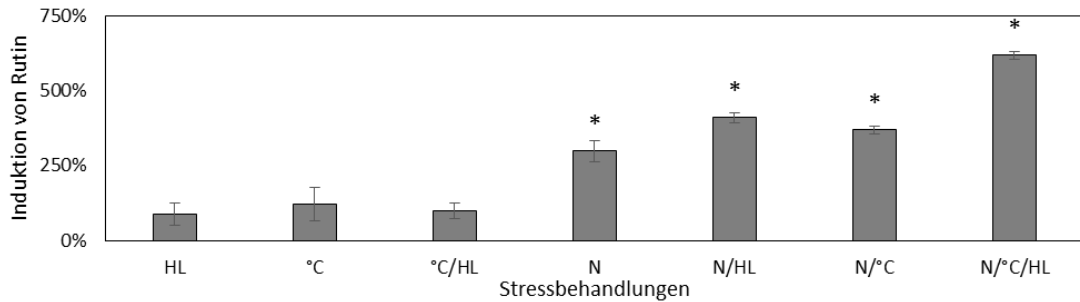


Fig. 1: Induktion des Rutingehaltes in den Blättern von Tomatenpflanzen unter abiotischen Stressbehandlungen relativ zu Kontrollpflanzen nach 7 Tagen Stressbehandlung unter kontrollierten Bedingungen (HL: Hochlicht, °C: nächtliche Kälte, N: Stickstoffmangel; Sternchen markieren eine signifikante Erhöhung,  $n=4\pm\text{STF}$ ).

Der Gehalt des Isoprenoids Solanesol in den Blättern der Kontrollpflanzen betrug durchschnittlich  $25 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TM}$ . Der Gehalt an Solanesol war bei erhöhter Tagestemperatur stark erhöht, jedoch kaum durch erhöhte Lichtintensität beeinflusst (Fig. 2). Die Erhöhung der Tagestemperatur um  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  führte zu einer zwölffachen Induktion des Solanesolgehaltes in den Pflanzen.

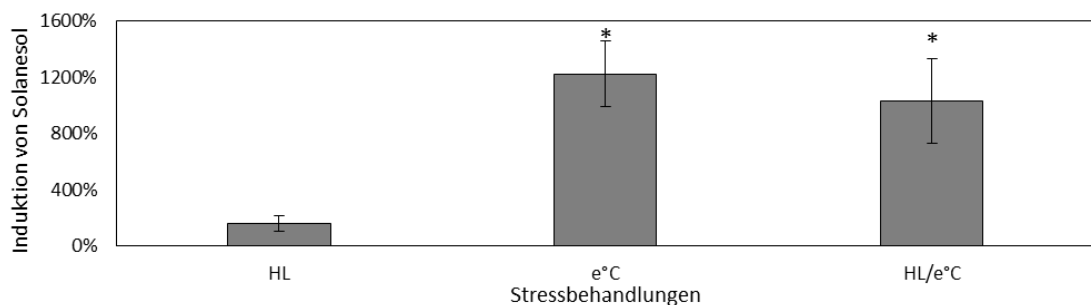


Fig. 2: Induktion des Solanesolgehaltes in den Blättern von Tomatenpflanzen unter abiotischen Stressbehandlungen relativ zu Kontrollpflanzen nach 7 Tagen Stressbehandlung unter kontrollierten Bedingungen (HL: Hochlicht, e°C: erhöhte Tagestemperatur; Sternchen markieren eine signifikante Erhöhung,  $n=4\pm\text{STF}$ ).

#### 4. Diskussion

In Experimenten mit jungen Tomatenpflanzen unter kontrollierten Bedingungen konnten Stressbehandlungen identifiziert werden, die eine Steigerung des Gehaltes von pflanzlichen Sekundärmetaboliten induzieren. Hierbei wurde eine 6-fache Induktion des Rutingehaltes unter Stickstoffmangel in Kombination mit erhöhter Lichtintensität und nächtlicher Kältebehandlung beobachtet (Fig. 1). Eine Steigerung von Phenolen und Flavonoidgehalten in Tomatenpflanzen unter Stickstoffmangel wurde bereits mehrfach beschrieben (Bénard et al., 2011; Løvdaal et al., 2010). Nichtsdestotrotz ist der Rutingehalt von  $0,77 \text{ } \text{‰}$  in der Trockenmasse nach der Stressbehandlung deutlich geringer verglichen zu Buchweizen, der üblicherweise zur Extraktion von Rutin genutzt wird, und bis zu  $10 \text{ } \%$  Rutin in der Trockenmasse enthält (Suzuki et al., 2005).

Der Solanesolgehalt von Tomatenblättern ist geringer verglichen zu dem Gehalt an Rutin, jedoch konnte eine stärkere Induktion erreicht werden (Fig. 2). Bei einer um 6 °C erhöhten Tagestemperatur verzehnfachte sich der Solanesolgehalt innerhalb von 7 Tagen auf 0,3 ‰ in der Trockenmasse. Eine sechsfache Induktion konnte bereits für Kartoffelpflanzen gezeigt werden, die eine Woche lang einer Erhöhung der Tagestemperatur um 8 °C auf 30 °C ausgesetzt waren (Campbell et al., 2016). Weitere Faktoren, die den Solanesolgehalt beeinflussen, sind genetische Variation sowie das Alter der Blätter. Der Solanesolgehalt in Linien von Tabak variiert von 0,3 % bis 1,7 % sowie in Kartoffelpflanzen von 0,1 ‰ bis 0,5 ‰ (Campbell et al., 2016). Auch in Tomaten wurden bis zu 0,35 % Solanesol gefunden (Kotipalli, 2008). Zudem konnte für Kartoffelpflanzen gezeigt werden, dass ältere Pflanzen generell höhere Solanesolgehalte aufweisen, mit einem bis zu 9-fachen Gehalt in älteren Pflanzen (Campbell et al., 2016). Eine Auswahl geeigneter Genotypen und Ernte von alten, ausgewachsenen Tomatenpflanzen unter induzierenden Bedingungen könnte somit zu einer noch stärkeren Anreicherung von Solanesol in Tomatenpflanzen führen. Zudem ist Solanesol aufgrund seiner höheren Wertigkeit als sehr vielversprechend für eine intensivierete Machbarkeitsstudie der Wertschöpfungskette einzuschätzen (Machado et al., 2010; Taylor und Fraser, 2011). Üblicherweise wird Solanesol aus Tabak extrahiert, der zu diesem Zweck angebaut wird (Yan et al., 2015). Der Gehalt an Solanesol in Tabak liegt generell ungefähr um den Faktor 10 höher verglichen zu Tomatenpflanzen (Kotipalli, 2008). Diese Diskrepanz könnte durch die Auswahl geeigneter Linien und Optimierung der Stressbehandlungen reduziert werden. Dadurch könnte eine Extraktion von Solanesol aus Tomatenrestbiomasse ökonomisch relevant werden und einen Mehrgewinn in der Tomatenproduktion erzeugen. Zusätzlich könnten die regionale Verfügbarkeit der Biomasse, sowie die kontrollierten Bedingungen, unter denen Tomatenpflanzen wachsen, und der daraus resultierenden gleichbleibenden Qualität der Biomasse, zu einer Konkurrenzfähigkeit des Modellprozesses beitragen.

Für die erfolgreiche Etablierung der neuartigen Wertschöpfungskette wird nun im Rahmen des Projektes InducTomE untersucht, welche Sekundärmetabolitgehalte durch Stickstoffmangel und erhöhte Temperatur in Produktionsgewächshäusern erreicht werden können. Neben der Induktion durch die applizierten Behandlungen wird auch die technische Umsetzung, die gartenbauliche Integration in Produktionsprozesse und die Akzeptanz der Betreiber, bestehende Produktionsabläufe zu verändern, evaluiert.

## **5. Schlussfolgerung**

Wir konnten erfolgreich zeigen, dass der Gehalt an Sekundärmetaboliten in den Blättern von Tomatenpflanzen durch abiotische Stressbehandlungen induziert werden kann. Die in unserem Experiment beobachtete starke Induktion des Solanesolgehaltes zeigt das Potential von Tomatenpflanzen zur Produktion von Sekundärmetaboliten auf. Im Rahmen des Projektes InducTomE werden unsere Ergebnisse zusammen mit Versuchen zu Stressbehandlungen in Gewächshäusern unter Produktionsbedingungen und der Entwicklung einer kostengünstigen und umweltfreundlichen Extraktionsmethode genutzt, um den Modellprozess zu evaluieren. InducTomE zeigt eine alternative bioökonomische Nutzung pflanzlicher Nebenprodukte zur Gewinnung hochwertiger Sekundärmetabolite auf, die zu einem Mehrwert beim Anbau gartenbaulicher Kulturen führen können.

Das Projekt InducTomE wurde durch das Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung innerhalb des Bioeconomy Science Center gefördert (No. 313/323-400-002 13).

## 6. Literatur

- Bénard, C., Bourgaud, F., Gautier, H. (2011). Impact of Temporary Nitrogen Deprivation on Tomato Leaf Phenolics. *International Journal of Molecular Sciences* 12:7971.
- Campbell, R., Freitag, S., Bryan, G.J., Stewart, D., Taylor, M.A. (2016). Environmental and Genetic Factors Associated with Solanesol Accumulation in Potato Leaves. *Frontiers in Plant Science* 7:1263.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163.
- Dixon, R.A., Steele, C.L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* 4:394-400.
- Kotipalli, P.K. (2008). Estimation of solanesol in tobacco and non-tobacco plants from Solanaceae family. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 1.
- Løvdaal, T., Olsen, K.M., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C. (2010). Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71:605-613.
- Machado, P.A., Fu, H., Kratochvil, R.J., Yuan, Y., Hahm, T.S., Sabliov, C.M., Wei, C.I., Lo, Y.M. (2010). Recovery of solanesol from tobacco as a value-added byproduct for alternative applications. *Bioresource technology* 101:1091-1096.
- Oksman-Caldentey, K.-M., Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9:433-440.
- Olsen, K., Slimestad, R., Lea, U.S., Brede, C., Løvdaal, T., Ruoff, P., Verheul, M., Lillo, C. (2009). Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell and Environment* 32:286-99.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:1720-1731.
- Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y. (2005). Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. *Plant Science* 168:1303-1307.
- Taylor, M.A., Fraser, P.D. (2011). Solanesol: Added value from Solanaceous waste. *Phytochemistry* 72:1323-1327.
- Yan, N., Liu, Y., Gong, D., Du, Y., Zhang, H., Zhang, Z. (2015). Solanesol: a review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 14:403-417.
- Zhao, C., Li, C., Zu, Y. (2007). Rapid and quantitative determination of solanesol in *Nicotiana tabacum* by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44:35–40.