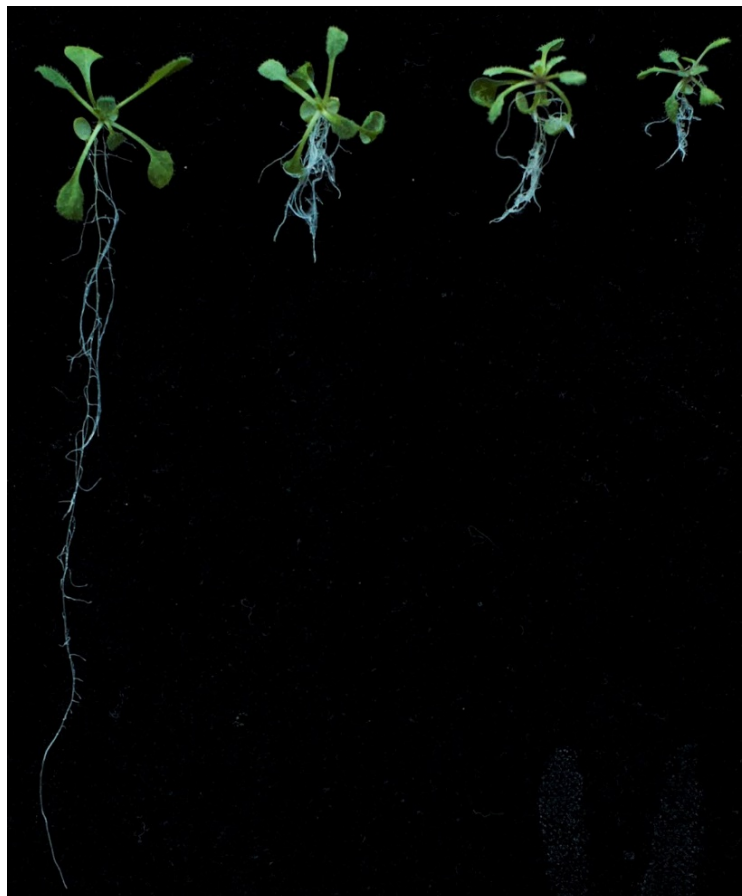


Allelopatiska egenskaper av tomatidin och andra alkaloider från potatisväxter

Lukas Hallberg



Allelopatiska egenskaper av tomatidin och andra alkaloider från potatisväxter

Lukas Hallberg

Handledare: Folke Sitbon, SLU, Institutionen för växtbiologi

Examinator: Björn Nicander, SLU, Institutionen för växtbiologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi - kandidatarbete **Kurskod:** EX0689

Program/utbildning: Agronomprogrammet - mark/växt

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Omslagsbild: Folke Sitbon

Seriens titel: Examensarbete / Institutionen för växtbiologi, SLU

Nummer: 162

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Allelopati, tomatidin, alkaloider, steroler

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap
Institutionen för växtbiologi

Sammanfattning

Alkaloider är en heterogen grupp av sekundära metaboliter i växter med toxiska egenskaper. Dessa ämnen har ofta toxiska effekter på olika organismer och finns bland annat i flera arter inom potatisväxtfamiljen (*Solanaceae*). Denna studie visar att alkaloiden tomatidin från tomat (*Solanum lycopersicum*) verkar allelopatiskt på arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, cv. Col), blåklint (*Cyanus segetum*) och tobak (*Nicotiana tabacum*, cv. SRI) men inte tomat. Den allelopatiska effekten visades vara specifik för tomatidin, övriga 8 strukturellt lika alkaloider från potatisväxter som testades visade inte samma effekt. Växtmaterialet odlades i MS-medium med tomatidin som verkade inhiberande på rottillväxten på grund av en icke fungerande cellsträckning. Rötternas morfologi förändrades och blev kortare vid närvaro av 1 – 5 μM tomatidin. Tillsats av steroler eller växthormoner till arabidopsis som odlades i tomatidin stimulerade inte rottillväxten.

Groning av frön från olika jordbruksväxter påverkades inte av tomatidin men tillväxten hämmades vilket resulterade i signifikant färre grodda linfrön (*Linum usitatissimum*).

Nyckelord: Allelopati, alkaloider, tomatidin, steroler

Abstract

Alkaloids are a heterogeneous group of secondary metabolites in plants with toxic attributes. These substances often have toxic effects on different organisms and are found in many species of the nightshade family (*Solanaceae*). This study shows that the alkaloid tomatidine from tomato (*Solanum lycopersicum*) are allelopathic to arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, cv. Col), cornflower (*Cyanus segetum*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*, cv. SRI) but not to tomato itself. The allelopathic effect were shown to be specific for tomatidine, the other 8 structurally similar alkaloids from nightshades that were tested did not yield the same effect. The plant material was grown in MS-medium containing tomatidine and its root growth were inhibited due to impaired cell elongation. The roots were deformed and shorter in the presence of 1 - 5 μM tomatidine compared to untreated control plants. The addition of sterols or plant hormones to arabidopsis grown in tomatidine did not stimulate the root growth.

Germination of seeds from different agricultural plants were not affected by tomatidine, however, the growth was retarded which resulted in significantly less germinating seeds of flax (*Linum usitatissimum*).

Innehållsförteckning

Figurförteckning	4
Förkortningar	5
1 Syfte med studien	7
2 Inledning	8
2.1 Allmänt om växters försvar	8
2.2 Allelopati	8
2.3 Glykoalkaloider	9
2.4 Steroler	11
2.5 Växthormoner	11
3 Material och metoder	12
3.1 Förgroning	12
3.2 Alkaloiders allelopatiska egenskaper	12
3.3 Sterol- och hormonkomplementering av tomatidins allelopatiska effekt	13
3.4 Tomatidins inverkan på groning av olika växtarter	13
3.5 Tomatidins inverkan på tillväxt av olika växtarter	13
4 Resultat	15
4.1 Glykoalkaloider och aglykoners inverkan på arabidopsis rottillväxt	15
4.2 Sterol- och hormonkomplementering av tomatidins allelopatiska effekt	17
4.3 Tomatidins inverkan på groning av olika växtarter	20
4.4 Tomatidins inverkan på tillväxt hos olika växtarter	20
5 Diskussion	26
6 Slutsats	28
Referenslista	29
Bilagor	31

Figurförteckning

<i>Figur 1.</i> Alkaloiders kemiska strukturer.	10
<i>Figur 2.</i> Alkaloider inhiberar arabidopsis rottillväxt.	16
<i>Figur 3.</i> Tomatidin inhiberar arabidopsis rottillväxt.	17
<i>Figur 4.</i> Tomatidins inhibering vid komplementering av steroler.	18
<i>Figur 5.</i> MBCD stimulerar rottillväxt.	19
<i>Figur 6.</i> Tomatidins inhibering vid komplementering av hormoner.	19
<i>Figur 7.</i> Tomatidins inverkan på färskvikt av rot- och bladmassa.	21
<i>Figur 8.</i> Tomatidins inverkan på arabidopsis bladmassa.	22
<i>Figur 9.</i> Tomatidins inverkan på morfologin av blåklints rot- och bladmassa	23
<i>Figur 10.</i> Tomatidins inverkan på morfologin av tobaks rot- och bladmassa	24
<i>Figur 11.</i> Tomatidins inverkan på morfologin av tomats rot- och bladmassa	25

Förkortningar

GA3 – Gibberellinsyra 3

IAA - Indolyl-3-ättiksyra

MBCD - Metyl- β -cyclodextrin

NAA - Naftalenättiksyra

SGA - Steroidala glykoalkaloider

1 Syfte med studien

Ogräs är globalt sett den största störningsfaktorn i jordbruk. Skördar av de viktigaste jordbruksgrödorna sänks årligen med i genomsnitt 34 % på grund av oönskad konkurrens med ogräs. Denna andel är större än den som orsakas av alla andra skadegörare eller abiotiska faktorer. Modern ogräsbekämpning domineras av herbicider, mekanisk bekämpning och handplockning, vilket medför både stora arbetskostnader och ekologiska risker. Med stor tyngdpunkt på kemiska herbicider riskeras utbredd herbicidresistens och miljöproblem kopplade till toxicitet. (Jabran, et al., 2015).

Det finns alternativa metoder till traditionell bekämpning av ogräs. Istället för att aktivt tillsätta kemiska ämnen kan växters naturliga försvar mot annan konkurrerande växtlighet användas. Växters kemiska eller fysiska påverkan av andra växter går under namnet allelopati. Den påverkan som är intressant vid ogräsbekämpning är olika former av störningar av ogräsens groning och utveckling (Taiz & Zeiger, 2006).

I en tidigare studie (Åkesson, 2014) visades alkaloiden tomatidin vara allelopatisk. Syftet med denna studie är att bygga vidare på den observationen och undersöka om även andra alkaloider från potatisväxtfamiljen (*Solanaceae*) har allelopatisk effekt. Utöver detta undersöktes bakomliggande mekanismer av den allelopatiska effekt som alkaloiderna ger upphov till. Detta genomförs för att värdera potentialen i att tillämpa allelopatisk ogräsbekämpning med alkaloider från potatisväxter vid kultivering.

Dataunderlag i försöken utgörs av mätningar av rottillväxt, färskvikt av växtdelar, fotografier och okulära observationer av växter. Vid försök med rottillväxt användes en kvantitativ metod, bearbetning med statistiska verktyg gav underlag till en induktiv diskussion kring resultaten. Metoden vid tillväxtförsök var även av kvalitativ karaktär.

2 Inledning

2.1 Allmänt om växters försvar

En karaktäristisk egenskap hos alla växter är deras oförmåga att röra sig bort från olika stressfaktorer, abiotiska såväl som levande. Stillasittande primärproducenter lever under det ständiga hotet att ätas av heterotrofer som, direkt eller indirekt, är helt beroende av det kol som fixeras av växternas fotosyntes. Det har lett till ett starkt evolutionärt selektionstryck för växter att utveckla försvarsmekanismer med egenskaper kan avskräcka eller skada herbivorer. De växter som har ett effektivt försvar mot angripande skadegörare får en konkurrensfördel mot andra växter som är mindre effektiva. En del av växtförsvaret utgörs av kemiska substanser som kallas för sekundära metaboliter eftersom de är modifierade utifrån de primära metaboliter som krävs för livsnödvändiga processer i växter. Sekundära metaboliter har på så sätt samma biokemiska ursprung som de primära metaboliterna, men andra funktioner. Produktionen av dessa kemiska substanser utgör en kostnad för växten som begränsas av tillgången på främst energi, kol och kväve som även ska fördelas över primära metaboliter. Det blir en avvägning mellan de olika grupperna. Det kemiska försvaret kan även delas upp mellan konstitutivt och inducerbart försvar. Ett konstitutivt försvar är ständigt närvarande i växten och kräver ingen yttre signal för att aktiveras, nackdelen är att det kostar resurser att ha ett sådant försvar igång hela tiden. Det inducerbara försvaret är latent och aktiveras först när specifika elicitorer från herbivorer binder till växtens motsvarande effektorer. Det kräver mindre resurser när det inte är aktiverat, men om antagonisten inte känns igen av växten kan det leda till utebliven försvarsreaktion. Växter tillämpar ofta en kombination av båda försvarstyperna eftersom de kompletterar varandra (Mithöfer & Boland, 2012).

2.2 Allelopati

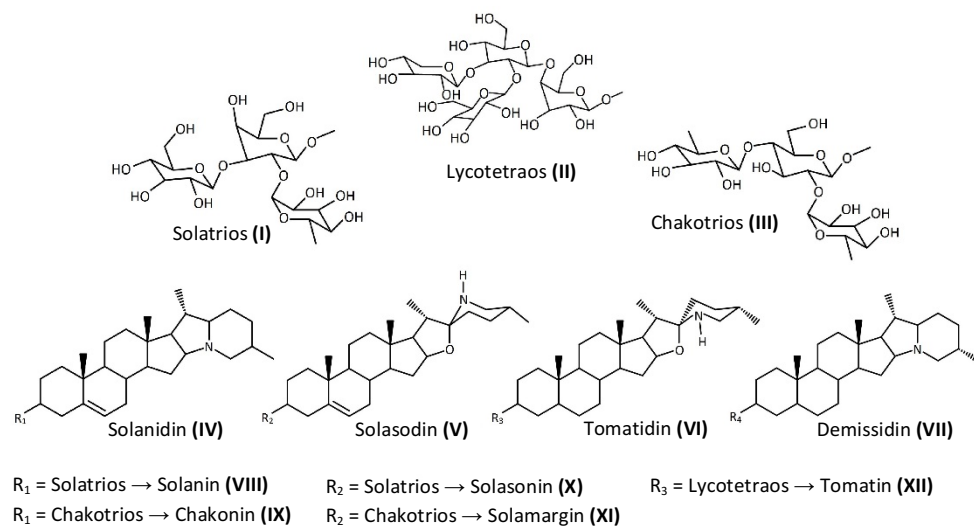
Växter utsöndrar många substanser via sina rötter, det gemensamma namnet för detta är rotexudat. Dessa ämnen kan interagera med mikrober och även påverka markkemin abiotiskt så att växten lättare kan ta upp näringsämnen eller skyddas från upptag av skadliga ämnen. Rotexudat kan även vara ett medium för kemisk interaktion mellan växter, även kallat allelopati. Vissa sekundära metaboliter som utsöndras från växtrötter har allelopatiska effekter på andra växter vilket innefattar både positiv och negativ påverkan. Ett exempel på en art som tillämpar allelopati i skadliga syften är *Centaurea maculosa* från klintsläktet som är ett invasivt ogräs i Nordamerika. *Centaurea maculosa* koloniserar stora områden av betesmark och prärier i USA och har lyckats konkurrera ut många inhemska arter (Taiz & Zeiger,

2006). Allelopatiska effekter har även observerats hos kråkbär (*Empetrum nigrum*) som är ett vintergrönt ris förekommande i Sverige. Den aktiva substansen, batatasin-III, har identifierats och inhiberar groningen och tillväxt för andra växter. Kråkbär har uppmärksammats som en störningsfaktor vid etablering av kommersiell skogsproduktion (González, et al., 2015). Inom *Solanum*-släktet finns det även växter med allelopatisk förmåga. Ogräset nattskatta (*Solanum nigrum*) har visats störa frögroning av foderärt (*Pisum sativum*), fodervicker (*Vicia sativa*) och sojaböna (*Glycine max*) (Marinov-Serafimov, 2010). Det finns flera aktiva substanser i nattskatta som samverkar, bland annat alkaloiderna atropin, hyoscin och solanin samt olika fettsyror (Sabh & Ali, 2010).

2.3 Glykoalkaloider

Alkaloider är en stor grupp av kväveinnehållande ämnen producerade av många olika växtfamiljer. Med över 20 olika undergrupper fyller de otaliga funktioner i växter och kan vara både primära eller sekundära metaboliter. Koffein, nikotin, kokain och morfin är alla exempel på alkaloider (Mithöfer & Boland, 2012). Glykoalkaloider är alkaloider med en sockermolekyl som sidokedja. De förekommer i potatis- och liljeväxtfamiljerna, över 100 olika glykoalkaloider har isolerats i 350 *Solanum*-arter (Patel, et al., 2013). Potatisväxter innefattar grödor som potatis (*Solanum tuberosum*), tomat, aubergine (*Solanum melongena*), chili (*Capsicum spp.*), tobak med flera (Friedman, 2002). Förekomst och koncentration av glykoalkaloider i potatisväxter varierar mellan arter men i de som innehåller glykoalkaloider påträffas högre halter i växtdelar med hög metabolisk aktivitet som blommor, groddar och skott. Vid skador och ljusexponering ökar koncentrationen (Arnqvist, et al., 2003). Glykoalkaloider är sekundära metaboliter och en del av växtens kemiska försvar mot herbivorer, och har antimikrobiella, insekticida och fungicida egenskaper (Patel, et al., 2013). I tillräcklig koncentration är de giftiga även för människor och kan orsaka magsmärtor, kräkningar och diarré. Gränsvärdet för human konsumtion av potatisknölar är i Sverige fastställt av Livsmedelsverket till 200 mg glykoalkaloider kg^{-1} färskvikt. Glykoalkaloider som härstammar från sterolbiosyntesen kallas för steroidala glykoalkaloider (SGA). SGA består av en aglykon som glykosylerats med en sockermolekyl på C-3-position i b-orientering (Patel, et al., 2013). Den vanligast förekommande SGA i tomat är tomatin (Figur 1, XII) och den består av aglykonen tomatidin (VI) som glykosylerats med sockermolekylen lycotetraos (II). Tomatin återfinns i hög koncentration i unga gröna frukter men bryts sedan ner vid fruktmognad (Friedman, 2002). Tomatins och andra SGAs toxiska egenskaper är kopplade till dess förmåga att komplexbinda fria steroler och göra dem otillgängliga

för cellinteraktioner. Cellmembran lyserar utan fria steroler eftersom sterolerna utgör en integrerad del i cellmembranet och är nödvändiga för dess stabilitet och rätta funktion (Roddick, 1979). Tomatins aglykon tomatidin har sitt ursprung från sterolsyntesen (Friedman, 2002) och det är visat att även tomatidin är toxiskt men det komplexbinder inte steroler likt SGA (Roddick, 1979). Det har föreslagits att tomatidins toxicitet för protozoer av släktet *Leishmania* beror på inhibering av sterolsyntesen vilket resulterar i brist på essentiella steroler nödvändiga för en intakt cellstruktur (Medina, et al., 2012). Tillväxt av jästsvampen *Saccharomyces cerevisiae* inhiberas av tomatidin på liknande sätt då syntesen av ergosterol blockeras (Simons, et al., 2006). I potatis och dess vilda släktingar förekommer olika SGA som likt tomatin komplexbinder steroler och är toxiska för många organismer (Friedman, et al., 1997). De två vanligaste och giftigaste är solanin (VIII) och chakonin (IX). De delar samma aglykon som grund, solanidin (IV), men har två olika sockermolekyler bundna; solatrios (I) och chakotrios (III). De resterande två SGA i potatis är solasonin (X) och solamargin (XI) som även de är glykosylerade med solatrios respektive chakotrios men är baserade på aglykonen solasodin (V). Aglykonen demissidin (VII) finns i flertalet vilda potatissläktingar. Sammantaget finns minst 90 olika alkaloider identifierade i potatissläktet (Friedman, et al., 1997).



Figur 1. Alkaloiders kemiska strukturer. Glykoalkaloider och dess motsvarande aglykoner och sockermolekyler.

2.4 Steroler

Steroler är en grupp molekyler som är essentiella för alla levande organismer och ingår i en mängd olika biokemiska interaktioner. Fria steroler utgör viktiga komponenter i cellmembran och behövs för att upprätthålla rätt cellfunktion och membranegenskaper som fluiditet och genomsläpplighet. De har även reglerande funktioner och styr embryonal utveckling i vertebrater och bildar mikrodomäner i cellmembran som är centrum för olika signalvägar. Steroler är dessutom byggstenar vid syntes av hormoner och sekundära metaboliter. Högre växter, alger, svampar och ryggradsdjur kan syntetisera sina egna steroler, insekter saknar däremot den förmågan och behöver få i sig steroler via föda. I högre växter förekommer sitosterol i störst mängd men även andra steroler som kolesterol, campesterol, stigmasterol och fucosterol är av betydelse. För ryggradsdjur är främst kolesterol den viktigaste sterolen. Mycket är fortfarande okänt om sterolers funktion i växters signaltransduktion men det finns indikationer på att steroler styr polariteten hos positionsberoende celler (Benveniste, 2004).

2.5 Växthormoner

IAA är ett växthormon som styr tillväxt och utveckling hos växter. Eftersom IAA är toxiskt för växter i för höga halter bryts det snabbt ner internt när responsen från hormonet är färdig. Substanser som liknar IAA kallas för auxiner, NAA är ett exempel på ett artificiellt syntetiserat auxin. Auxiner har länge använts som herbicider eftersom utvändigt exponering av substanserna i stora mängder även är toxiskt. För att celler ska kunna transportera växthormonet IAA i en bestämd riktning krävs det cellpolaritet med asymmetriskt ordnade komponenter i cellmembranet så att transporten går i en basipetal. Polär transport av IAA är starkt reglerad för att växten ska kunna upprätthålla korrekt tillväxt och utveckling. Gibberelliner är en annan grupp växthormoner som främjar cellsträckning, frögroning, övergång till blomning, pollenproduktion och fruktutveckling. Brassinolid är ett tillväxtfrämjande växthormon tillhörande gruppen brassinosteroider. Brassinolid återfinns endast i väldigt låga koncentrationer i växtdelar. Förutom tillväxt reglerar det även celldelning, cellsträckning, celldifferentiering, ljusberoende utveckling, reproduktiv utveckling, frögroning och stressrespons. Muterade arabidopsisplantor utan brassinolidsyntes är kortväxta på grund av störd tillväxt och utveckling. Brassinolid är en produkt från växters sterolsyntes och liknar strukturellt kolesterol (Taiz & Zeiger, 2006).

3 Material och metoder

3.1 Förgroning

Växterna arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, cv. Col), blåklint (*Cyanus segetum*), tobak (*Nicotiana tabacum*, cv. SRI) och tomat (*Solanum lycopersicum*, cv. Money-maker) förgröddes mellan 5-13 dagar på 10 cm kvadratiska groningsplattor i MS-medium (pH 5,6), 1 % sukros och solidifierat med 0,3 % Gelrite. Frön steriliserades med 1:3 delar klorin och Milli-Q-vatten i 5 minuter och sköljdes sedan 5 gånger med sterilt vatten.

3.2 Alkaloiders allelopatiska egenskaper

De alkaloider som ingick i kartläggningen över allelopatiska egenskaper var fem glykoalkaloider; chakonin (Figur 1, IX), solamargin (XI), solanin (VIII), solasonin (X) och tomatin (XII) samt fyra aglykoner; demissidin (VII), solanidin (IV), solasodin (V) och tomatidin (VI). Dessa alkaloider löstes i etanol och gjöts i olika koncentrationer med sterilt MS-medium (pH 5,6), 1 % sukros och solidifierat med 0,3 % Gelrite. Förgrödda arabidopsisplantor, 8-11 st per platta, planterades med 1 cm mellanrum. Plattor ställdes på högkant för vertikal tillväxt. Rötternas startposition markerades efter 6 timmar initial tillväxt och rotlängden mättes sedan efter ytterligare 48 timmar. Insamlad data behandlades statistiskt med tvåsidigt t-test i Excel.

Tabell 1. Försöksstruktur för kartläggning av alkaloiders allelopatiska egenskaper

	Alkaloid	Tillverkare	Slutkoncentration		
Glykoalkaloider	Chakonin	Extrasynth	1 μ M		
	Solanin	Extrasynth	1 μ M		
	Solamargin	Glycomix	1 μ M		
	Solasonin	Glycomix	1 μ M		
	Tomatin	Sigma	1 μ M		
Aglykoner	Solanidin	Extrasynth	1 μ M		
	Solasodin	Sigma	1 μ M		
	Tomatidin	Mpbio	0,5 μ M	1 μ M	2 μ M
	Demissidin	Extrasynth	1 μ M		

3.3 Sterol- och hormonkomplementering av tomatidins allelopatiska effekt

Sterolkomplementering gjordes med cykloartenol, kolesterol, lanosterol och sitosterol i koncentrationerna 0,5 - 5 μM . Steroler löstes i 9 % Metyl- β -cyclodextrin (MBCD). Försök gjordes även med enbart MBCD. Hormonkomplementering gjordes med två auxiner, indolyl-3-ättiksyra (IAA) och naftalenättiksyra (NAA) samt med brassinolid och gibberellinsyra (GA3) i koncentrationerna 0,01 nM - 1 μM . Steroler och hormoner gjöts med och utan tomatidin i sterilt MS-medium (pH 5,6), 1 % sukros och solidifierat med 0,3 % Gelrite. På en platta planterades 10 förgrodda arabidopsis med 1 cm mellanrum. Plattor ställdes på högkant för vertikal tillväxt. Rötternas startposition markerades efter 5 - 22 timmar initial tillväxt och rotlängden mättes sedan efter ytterligare 48 - 72 timmar. Insamlad data behandlades statistiskt med tvåsidigt t-test i Excel och ensidig ANOVA i Statplus.

3.4 Tomatidins inverkan på groningen av olika växtarter

Försök gjordes på arabidopsis, blåklint, havre (*Avena sativa*), lin (*Linum usitatissimum*), rädisa (*Raphanus sativus*), sockermajs (*Zea mays*), solros (*Helianthus annuus*), spenat (*Spinacia oleracea*), tomat, vete (*Triticum aestivum*), och en vallblandning bestående av 50% rödsvingel (*Festuca rubra*), 30% engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), 10% westerwoldiskt rajgräs (*Lolium multiflorum*) och 10% ängsgröe (*Poa pratensis*). Försök gjordes i tråg vars botten täcktes med två lager hushållspapper, 200 ml tomatidinlösning i koncentrationerna 0 - 5 μM tillsattes i trågen. Frön från fem till sex arter placerades i separata grupper i ett tråg, de täcktes sedan med en genomskinlig kupa och placerades i växthus. Groningen mättes kvantitativt genom avräkning av grodda fröer 11 - 12 dagar efter sådd. Groning definierades som fullt utvecklade hjärtblad och grodden var etablerad efter 2 cm högt skott. Insamlad data behandlades statistiskt med χ^2 -test i Excel.

3.5 Tomatidins inverkan på tillväxt av olika växtarter

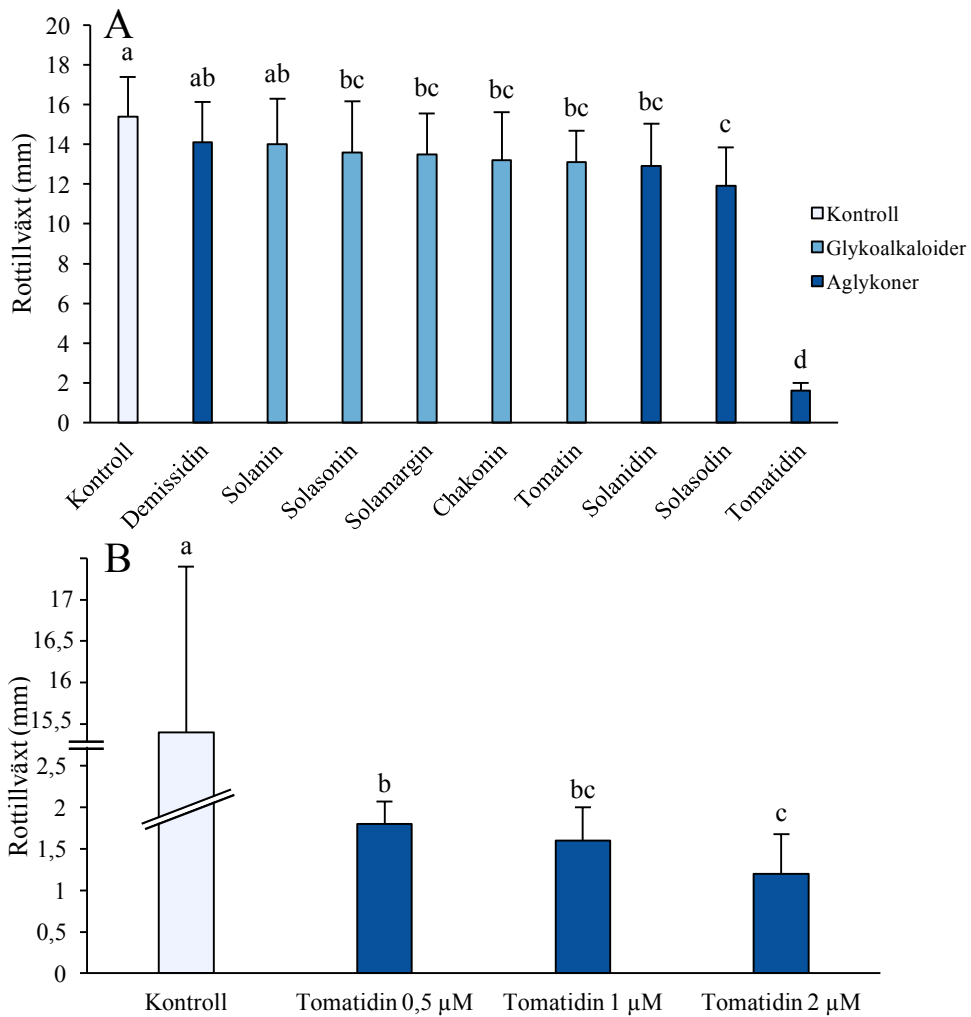
Försök gjordes på arabidopsis, blåklint, tobak och tomat. Tomatidin i koncentrationerna 0,04, 0,2, 1 och 5 μM gjöts med sterilt MS-medium (pH 5,6), 1 % sukros, och solidifierat med 0,3 % Gelrite i glasburkar. En förgrodd planta planterades per glasburk. Tillväxt observerades okulärt veckoligen. När någon växt började nå locket i burken fotograferades alla växter av den arten. Därefter klipptes de vid rotbasen och färskvikt av bladmassa och rötter vägdes. Arabidopsis odlades i 22 dygn,

blåklint i 16 - 22 dygn, tobak i 28 dygn och tomat i 21 dygn. Insamlad data behandlades statistiskt med tvåsidigt t-test i Excel och ensidig ANOVA i Statplus.

4 Resultat

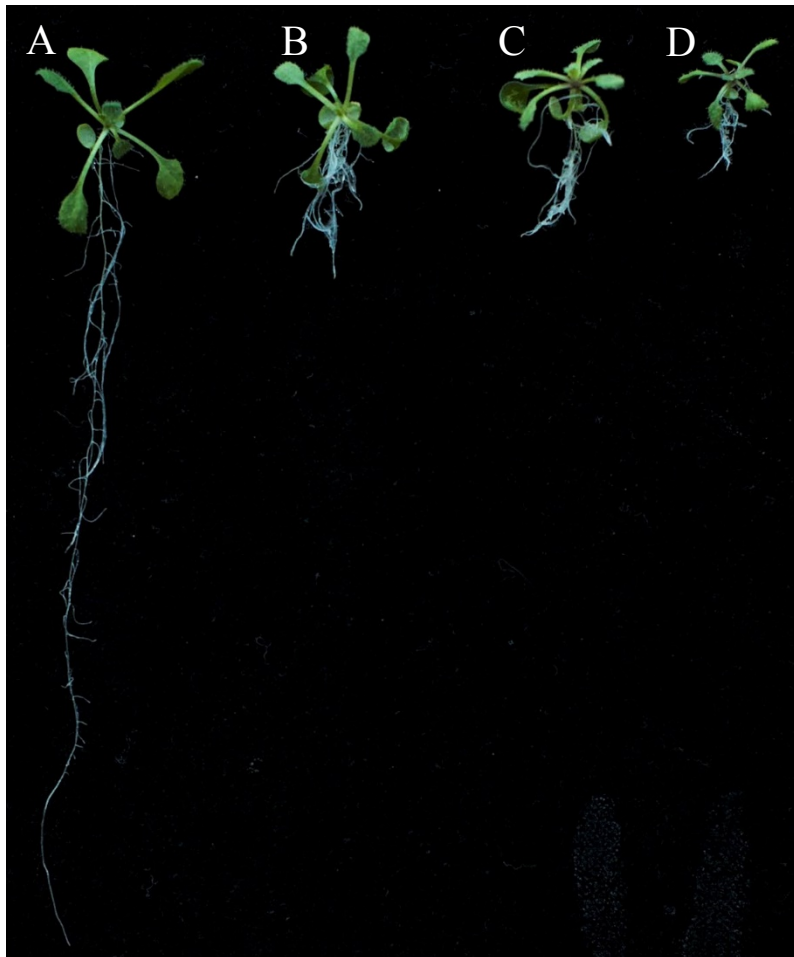
4.1 Glykoalkaloider och aglykoners inverkan på arabidopsis rottillväxt

Den fytotoxiska effekten av glykoalkaloiderna chakonin (Figur 1, IX), solamargin (XI), solanin (VIII), solasonin (X) och tomatin (XII), samt aglykonerna demissidin (VII), solanidin (IV), solasodin (V) och tomatidin (VI) studerades genom mätning av rottillväxt på arabidopsis (Figur 2, A). Tomatidin i koncentrationerna 0,5, 1 och 2 μM inhiberade rottillväxten signifikant (Figur 3). Effekten var dosberoende (Figur 2, B). Alla alkaloider inhiberade rottillväxten, effekten var signifikant för alla utom solanin och demissidin. Klart starkast effekt visade tomatidin.



Figur 2. Alkaloider inhiberar arabidopsis rottillväxt. **(A)** Inhiberande effekt av 1 µM av glykoalkaloiderna chakonin (IX), solanin (VIII), solamargin (XI) och tomatin (XII) samt aglykonerna solanidin (IV), solasodin (V), tomatidin (VI) och demissidin (VII). **(B)** Inhiberande effekt av tomatidin enligt angivna koncentrationer och kontroll.

Olika bokstäver ovanför staplarna betecknar signifikanta skillnader mellan genomsnittlig rottillväxt i de olika leden beräknat med t-test. Medelvärde och standardavvikelse visas för rottillväxt av 8 - 11 plantor per led förgrödda i 5 dagar. Rötternas startposition markerades efter 12 timmar initial tillväxt och mättes sedan efter ytterligare 48 timmar.

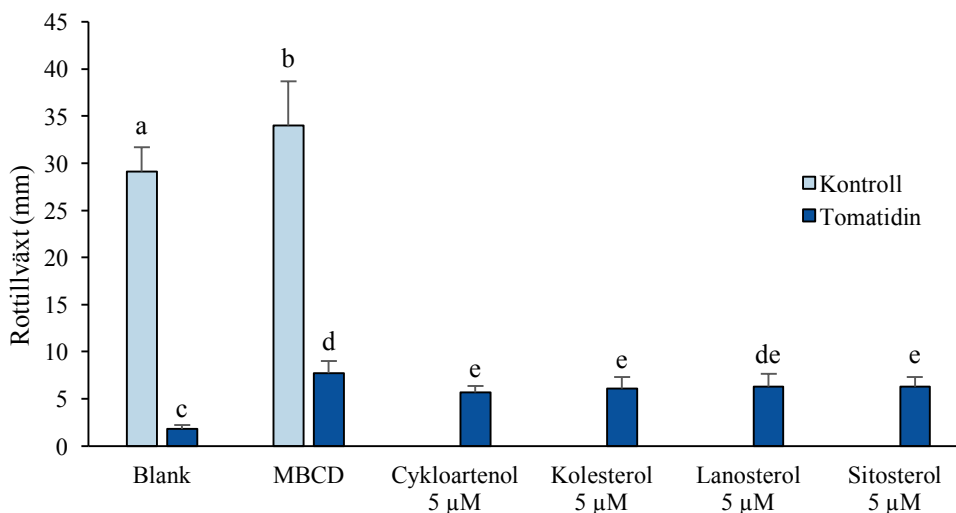


Figur 3. Tomatidin inhiberar *arabidopsis* rottillväxt. Representativt urval av växter från samma försök som i figur 2. (A) kontrollväxt, (B) 0,5 μ M tomatidin, (C) 1 μ M tomatidin, (D) 2 μ M tomatidin.

4.2 Sterol- och hormonkomplementering av tomatidins allelopatiska effekt

Följande försök gjordes med tomatidin eftersom det var den alkaloid som visat störst inhibering av *arabidopsis* rottillväxt. Tomatidins inhiberande effekt på *arabidopsis* rottillväxt undersöktes med komplementering av sterolerna cykloartenol, kolesterol, lanosterol och sitosterol löst i MBCD (Figur 4). De fyra sterolerna kombinerat med tomatidin resulterade i längre rötter än led med bara tomatidin. I relation till obehandlade led utan tomatidin komplementerade steroler och MBCD rottillväxten med 20 - 32% i genomsnitt. T-test mellan de fyra sterolerna visade inga signifikanta skillnader, men mellan MBCD och cykloartenol, kolesterol eller sitosterol var skillnaderna signifikanta. Försök gjordes mot bakgrund av studier som visat förändrade

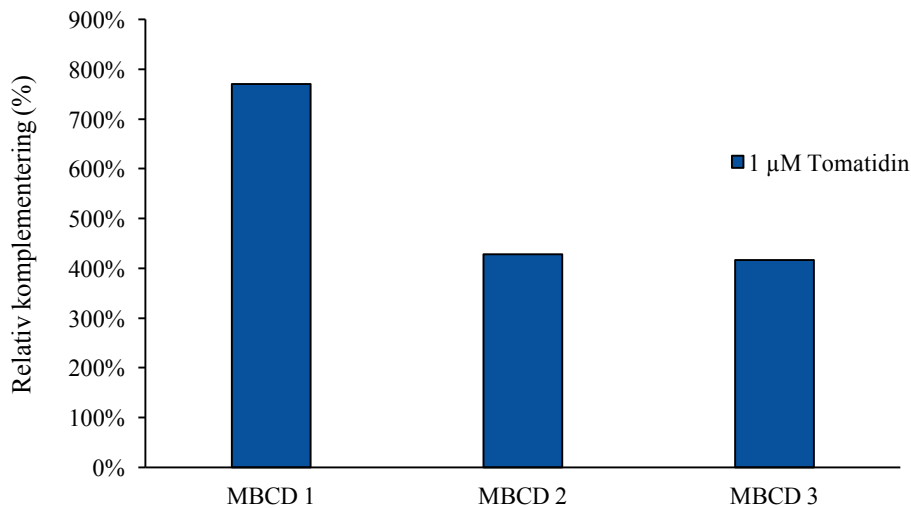
sterolkoncentrationer vid ackumulering av tomatidin i tomat (Itkin, et al., 2011). Steroler löstes i MBCD eftersom de är fettliknande och inte löses i vatten.



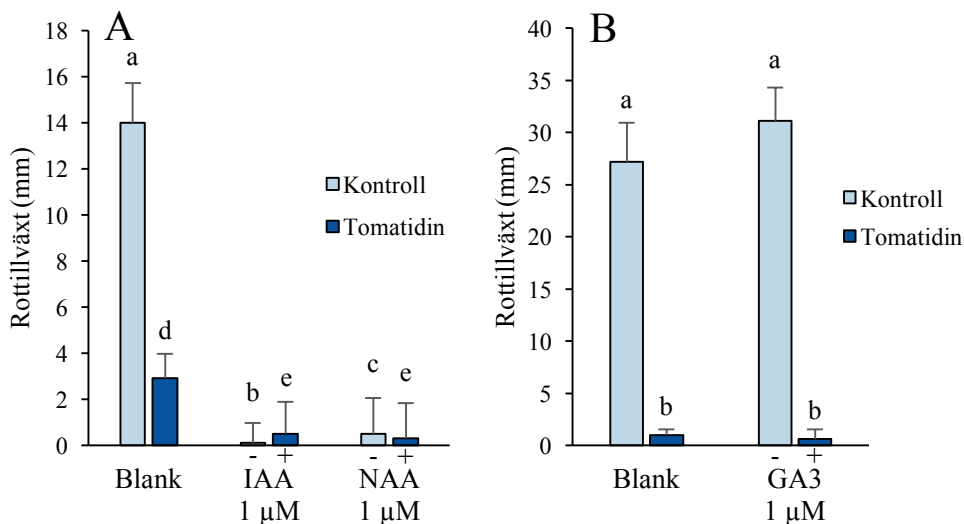
Figur 4. Tomatidins inhibering av arabidopsis rotttillväxt vid komplementering av steroler. 1 µM tomatidin komplementerat med cykloartenol, kolesterol, lanosterol och sitosterol i koncentration 5 µM löst i 9% MBCD och etanol. Representativt resultat från tre försök. Olika bokstäver ovanför staplarna betecknar signifikanta skillnader mellan genomsnittlig rotlängd i de olika leden beräknat med t-test. Medelvärde och standardavvikelse visas för rotlängd av 10 rötter per led. Rötternas startposition markerades efter 20 timmar initial tillväxt och mättes sedan efter ytterligare 72 timmar.

Lösningsmedlet MBCD komplementerade i sin egen rätt rotttillväxten då det tillsattes tillsammans med 1 µM tomatidin. Jämfört med tomatidinled ökade rotttillväxten med 417 - 770% (Figur 5).

Komplementeringsförsök gjordes även med auxinerna IAA och NAA samt GA3 (Figur 6). Båda auxiner inhiberade rotttillväxten starkt, med och utan tomatidin, och var signifikant skilt från led med 1 µM tomatidin. Rötter odlade i enbart IAA och NAA hade långa rothår längs primärroten men i led med auxiner och tomatidin var rothåren korta. Komplementering med GA3 gav ingen signifikant skillnad mot 1 µM tomatidin.



Figur 5. MBCD stimulerar rottillväxt. Relativ komplementering av arabidopsis rottillväxt med 9% MBCD vid 1 μ M tomatidin (VI). Genomsnittlig rottillväxt med MBCD satt i relation till led med enbart 1 μ M tomatidin (100%). Data från tre olika försök. Rötternas startposition markerades efter 18-22 timmar initial tillväxt och mättes sedan efter ytterligare 72 timmar.



Figur 6. Tomatidins inhibering av arabidopsis rottillväxt vid komplementering av hormoner. (A) Inhiberande effekt av 1 μ M IAA respektive NAA. Rötternas startposition markerades efter 5 timmar initial tillväxt och mättes sedan efter ytterligare 48 timmar. (B) Inhiberande effekt av 1 μ M GA3. Rötternas startposition markerades efter 12 timmar initial tillväxt och mättes sedan efter ytterligare 72 timmar.

Olika bokstäver ovanför staplarna betecknar signifikanta skillnader mellan genomsnittlig rottillväxt i de olika leden beräknat med t-test. Medelvärde och standardavvikelse visas för rottillväxt av 8-11 plantor per led förgrodda i 5 dagar.

4.3 Tomatidins inverkan på groningen av olika växtarter

Tomatidin påverkade groningen av lin negativt (Tabell 2). Andel grodda frön räknades och störst skillnad i groningen mellan 0 och 5 μM tomatidin hade lin och spenat med vardera 45 procentenheter färre grodda frön. χ^2 -test visade att enbart lins variation mellan behandlingarna var signifikant ($p < 0,033$). Övriga växter med färre grodda frön vid 5 μM tomatidin varierade inte signifikativt. Blåklint, tomat, och vallblandning hade en signifikant variation mellan de fyra olika behandlingarna men den var inte beroende av tomatidin. Mängden sådda frön varierade mellan arterna (Bilaga 1), så likartade skillnader kan ha olika statistiska signifikanser.

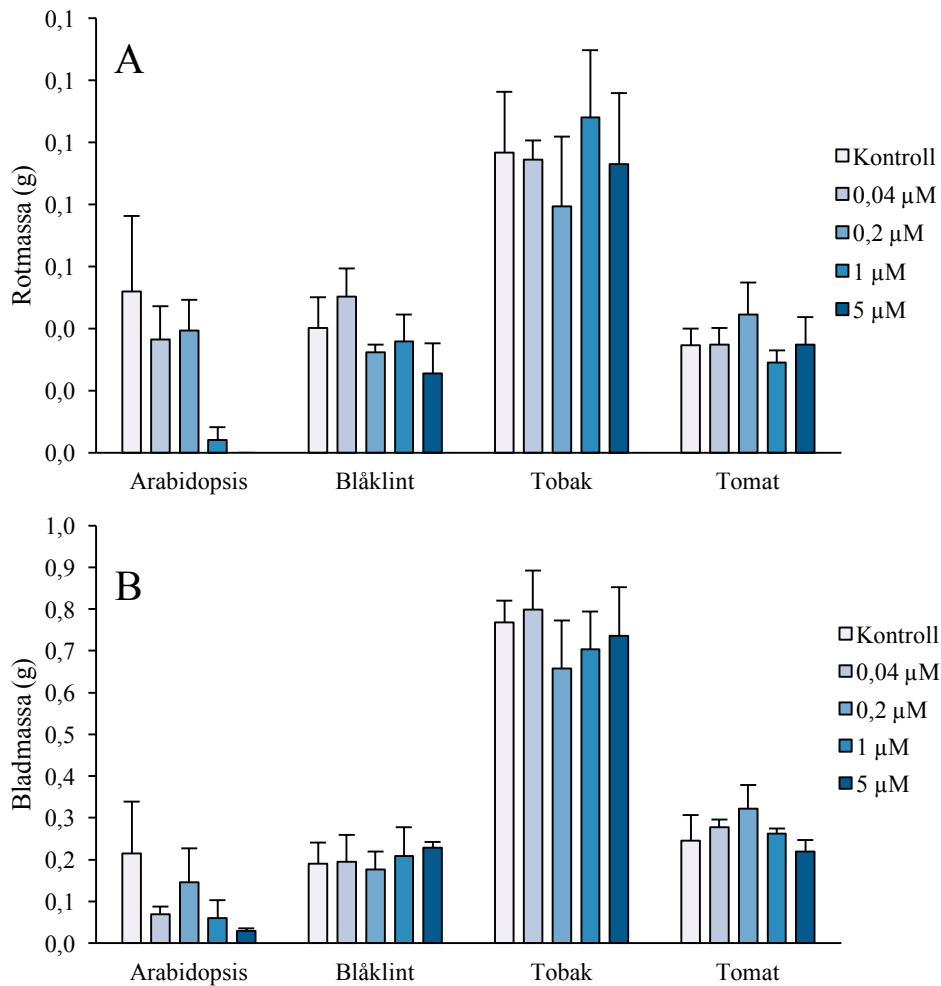
Tabell 2. *Tomatidins inverkan på groningen. Andel grodda frön från 10 växtarter och en vallblandning vid närvaro av tomatidin i koncentrationerna 0,1, 1 och 5 μM . Frön placerades i växthus och tilläts gro under 11-12 dygn. Vallblandning består av 50 % Rödsvingel (*Festuca rubra*), 30 % Engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), 10 % Westerwoldiskt rajgräs (*Lolium multiflorum*) och 10 % Ängsgröe (*Poa pratensis*). Signifikans visas från χ^2 -test*

Växt	Tomatidin (μM)				Signifikans
	Kontroll	0,1	1	5	
Arabidopsis	90 %	74 %	70 %	75 %	Ej signifikant
Blåklint	57 %	83 %	80 %	53 %	*
Havre	65 %	70 %	85 %	60 %	Ej signifikant
Lin	80 %	65 %	60 %	35 %	*
Rädisa	70 %	85 %	95 %	75 %	Ej signifikant
Sockermajs	45 %	20 %	35 %	25 %	Ej signifikant
Solros	50 %	40 %	60 %	60 %	Ej signifikant
Spenat	75 %	15 %	25 %	30 %	Ej signifikant
Tomat	40 %	10 %	70 %	50 %	**
Vallblandning	81 %	74 %	79 %	85 %	*
Vete	100 %	100 %	85 %	90 %	Ej signifikant

4.4 Tomatidins inverkan på tillväxt hos olika växtarter

Tomatidins effekt på tillväxt av rot- och bladmassa undersöktes i arabidopsis, blåklint, tobak och tomat för att ta reda på om tomatidin verkar inhiberande på fler arter och om det finns någon skillnad i tolerans mellan dessa. Tillväxten av arabidopsis rötter inhiberades vid tomatidinkoncentration över 1 μM . Färskvikt av rötter från arabidopsis i kontrollen var signifikant skild från både 1 och 5 μM tomatidin (Figur 7, A). Inga rötter återfanns vid 5 μM och t-test mellan kontroll och 1 μM gav p-värde 0,015. Övriga växters färskvikt av rötter hade inga signifikanta skillnader mellan de olika tomatidinkoncentrationerna. Färskvikt av arabidopsis bladmassa var svagt signifikant skild mellan kontroll och 5 μM tomatidin, t-test

gav p-värde 0,043 (Figur 7, B). Övriga växters färskvikt av bladmassa visade inga signifikanta skillnader mellan de olika leden.



Figur 7. Tomatidins inverkan på färskvikt av rot- och bladmassa. (A) Tomatidins effekt på färskvikt av rotmassa från arabidopsis, blåklint, tobak och tomat. Medelvärde och standardavvikelse av färskvikt från fyra plantor per art och behandling. Växter odlades i glasburkar enligt angivna tomatidinkoncentrationer. (B) Tomatidins effekt på färskvikt av bladmassa från arabidopsis, blåklint, tobak och tomat. Medelvärde och standardavvikelse av färskvikt från fyra plantor per art och behandling.

Arabidopsis bladmassa skiljde sig morfologiskt mellan de olika tomatidinkoncentrationerna (Figur 8). Växter i leden kontroll och 0,2 μM tomatidin hade börjat skjuta skott och blomma. I leden 1 och 5 μM tomatidin var storleken på bladen mindre och inga växter hade skjutit skott.

Blåklints rotsystem visade morfologiska skillnader mellan kontroll, 1 och 5 μM tomatidin (Figur 9, A). Växter i kontrollen hade en lång primärrot med långa sidorötter (A_1). I led med 1 μM tomatidin var primärroten lika lång men sidorötterna

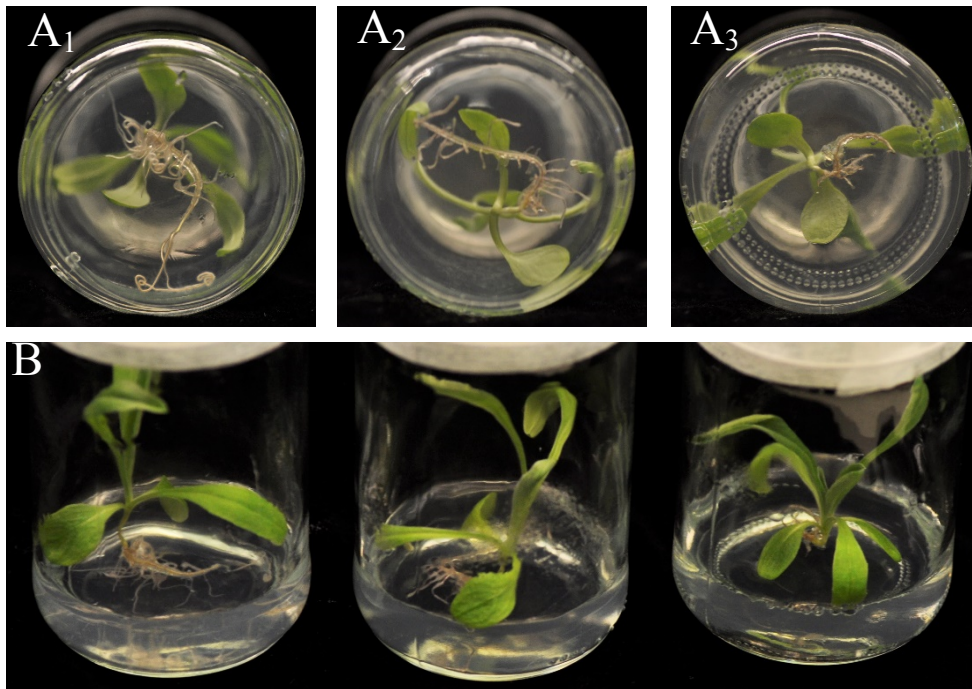
väsentligt kortare (A_2). Rötter i $5 \mu\text{M}$ tomatidin hade både kortare primärrot och sidorötter (A_3). Blåklints bladmassa skiljde sig inte morfologiskt mellan de olika behandlingarna (Figur 9, B).

Tomatidins morfologiska effekt på tobakens rotsystem var tydlig för växter odlade i $5 \mu\text{M}$ tomatidin (Figur 10, A). Tobaksrötter i kontrollen spred sig jämnt över hela ytan på glasbotten. Rötter i led med $5 \mu\text{M}$ tomatidin var kraftigt begränsade till centrum runt rotbasen men de var tjockare i omkrets än rötter från kontrollen. Inga skillnader i storlek på blad observerades i tobakens ovanjordiska bladmassa mellan de olika leden (Figur 10, B). En tendens till missfärgning av vävnad mellan bladnerverna i de äldsta bladen observerades vid $5 \mu\text{M}$ tomatidin.

Ingen morfologisk effekt av tomatidin observerades på tomat, varken ovanjordiskt eller i rotsystem (Figur 11).

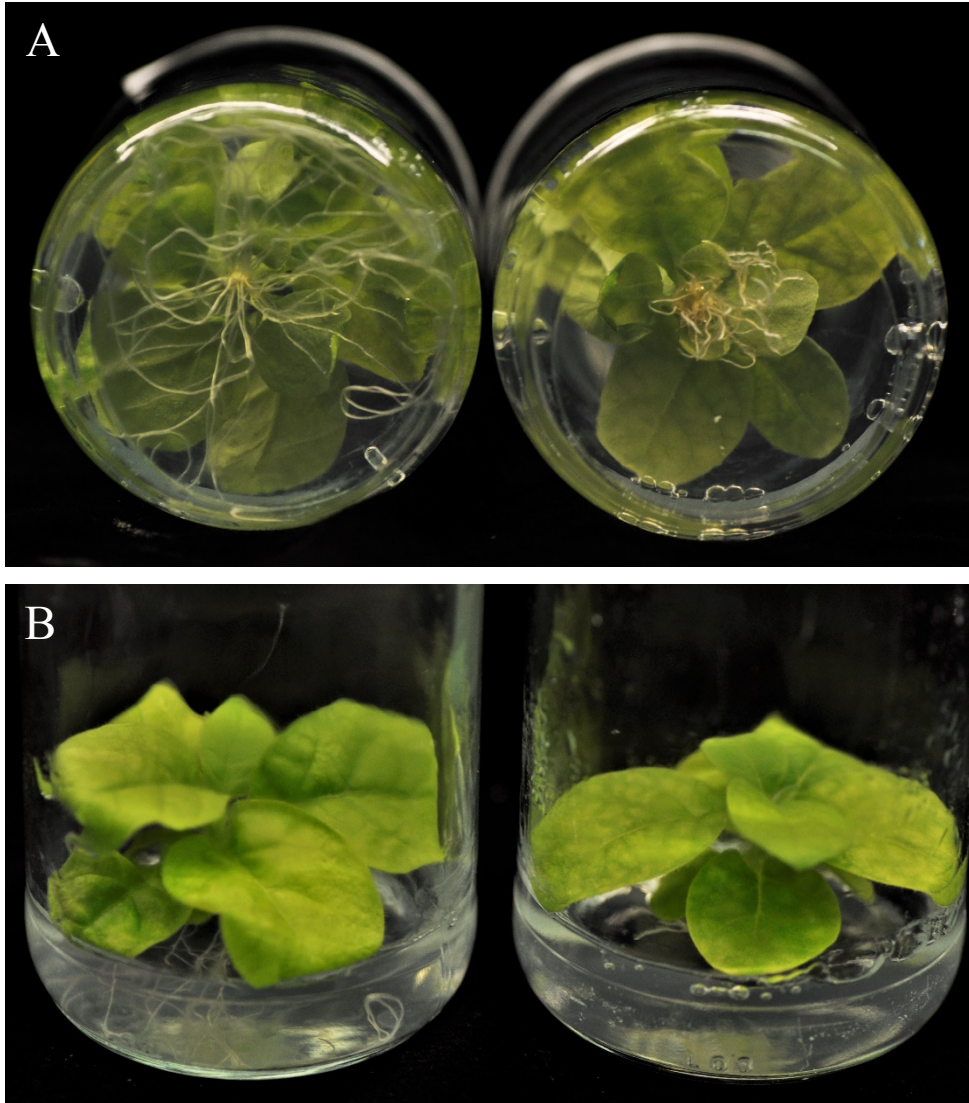


Figur 8. Tomatidins inverkan på *arabidopsis* ovanjordiska morfologi. Från vänster, Kontroll, 0,2, 1 och $5 \mu\text{M}$ tomatidin. Representativt urval av fyra växter per behandling. Växter odlade i 22 dygn.



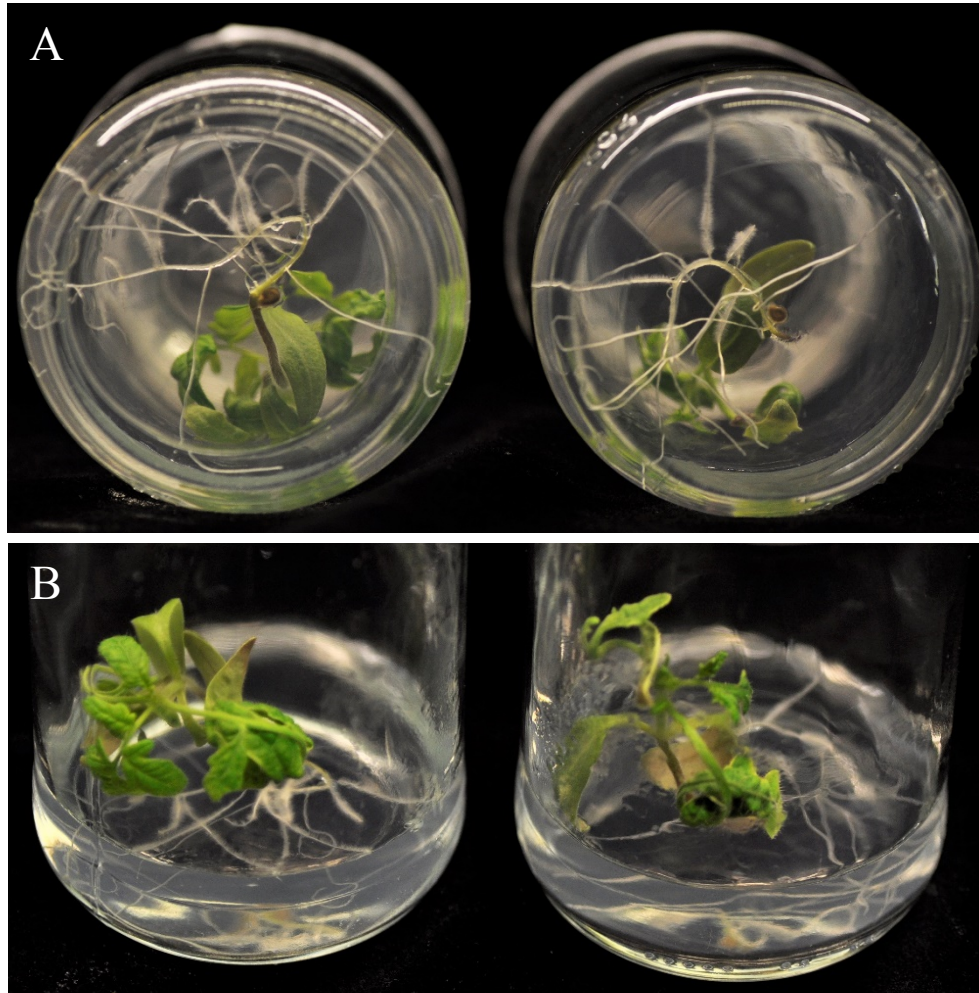
Figur 9. (A) Tomatidins inverkan på morfologin av blåklints rotsystem. (A₁) kontroll, (A₂) 1 μ M tomatidin, (A₃) 5 μ M tomatidin. (B) Tomatidins inverkan på blåklints ovanjordiska morfologi. Från vänster, kontroll, 1 och 5 μ M tomatidin.

Representativt urval av fyra växter per behandling. Växter odlade i 16 dygn.



Figur 10. **(A)** Tomatidins inverkan på morfologin av tobaks rotsystem. Från vänster, kontroll och 5 μM tomatidin. **(B)** Tomatidins inverkan på tobakens ovanjordiska morfologi. Från vänster, kontroll och 5 μM tomatidin.

Representativt urval av fyra växter per behandling. Växter odlade i 28 dygn.



Figur 11. (A) Tomatidins inverkan på morfologin av tomats rotsystem. Från vänster, kontroll och 5 μM tomatidin. (B) Tomatidins inverkan på tomats ovanjordiska morfologi. Från vänster, kontroll och 5 μM tomatidin.

Representativt urval av fyra växter per behandling. Växter odlade i 21 dygn.

5 Diskussion

Resultatet från kartläggningen över alkaloiders inverkan på arabidopsis rottillväxt visade att tomatidin (Figur 1, VI) hade störst inhiberande effekt (Figur 2 och Figur 3). Effekten var specifik för just tomatidin, övriga alkaloider som undersöktes var inte i närheten av samma inhibering. Man hade kunnat förvänta sig liknande inhibering från aglykonerna solasodin (V) och solanidin (IV) som är strukturellt väldigt lika tomatidin men så var inte fallet. Framför allt solasodin, vars orientering av kvävegruppen är den enda strukturella skillnaden från tomatidin. Tomatin (XII), som är uppbyggd av tomatidin, saknade även samma starka effekt.

I tillväxtförsöket var den inhiberande effekten av tomatidin tydligast på arabidopsis, både i avseende på färskvikt av rot- och bladmassa samt morfologi (Figur 7 och Figur 8). Effekterna på arabidopsis rot- och bladmassan kan vara av sekundär natur. Ett litet rotsystem har inte samma förmåga att tillgodogöra sig det vatten och den näring som krävs för normal tillväxt. Tobak och blåklint var oförändrade beträffande färskvikt av rot- och bladmassa vid de olika tomatidinbehandlingarna (Figur 7), men båda arterna hade kortare rötter vid 5 μM tomatidin jämfört med respektive kontrollen (Figur 9 och Figur 10). Rotbiomassan fördelades annorlunda i de korta rötterna, de blev tjockare men bibehöll samma vikt som de längre rötterna. Detta ger stöd för påståendet att rötternas metabolism inte störs av tomatidin. Tobakens blad blev missfärgade mellan bladnerverna på de äldsta bladen vid 5 μM tomatidin (Figur 10). De symptomen kan bero på kvävebrist; kortare rötter är sämre på att ta upp näring till växten (Tisdale, et al., 1985).

Växter odlade i glasburkar är inte begränsade av vatten, ljus eller näring. Vid mer fältliknande försök med tomatidin hade man kunnat vänta sig variationer även i bladmassa, eftersom ett kortare rotsystem inte har samma förmåga att tillgodogöra sig vatten och näring i konkurrens med andra växter och omvärldsfaktorer. Ytterligare en aspekt i tillväxtförsöket var att växterna troligen fick växa för länge, de blåklintväxter som såg friskast ut var de som såddes senast (2/5).

Avsaknaden av rottillväxt kan förklaras med en icke fungerande cellsträckning av rotceller. Exakt hur cellsträckningen sätts ur spel är inte känt men en tidigare studie har visat att muterade tomater som saknar genen GLYCOALKALOID METABOLISM1 (GAME1) ackumulerar tomatidin, blir dvärgväxta och får förändrade sterolkoncentrationer. Sitosterol och stigmasterol minskade medan campesterol ökade vid höga tomatidinkoncentrationer (Itkin, et al., 2011). Sterolers roll vid etablering av rätt cellpolaritet kan vara nyckeln till den störda cellsträckningen (Benveniste, 2004). I tillväxtförsöket var tomat helt opåverkad av tomatidin vid 5 μM (Figur 7

och Figur 11) men av tidigare studie att döma (Itkin, et al., 2011) kommer även tomat påverkas vid någon högre tomatidinkoncentration. Att just tomat tål tomatidin bra är en nödvändighet eftersom tomat producerar ämnet själv och har ett system för att hantera det. Mekanismen för att omsätta tomatidin i tomat har föreslagits vara kopplad till GAME1 vars produkt glykosylerar tomatidin med lycotetraos och bildar tomatin som inte är skadligt för växten (Itkin, et al., 2011).

De steroler som tillsattes lyckades inte komplementera arabidopsis rottillväxt (Figur 4), effekten av komplementeringen kan enbart tillskrivas MBCD som i egen rätt stimulerade rottillväxten (Figur 5). För att steroler ska tas upp och eventuellt komplementera växter måste de finnas i tillräcklig mängd och vara biologiskt tillgängliga för upptag. Anledning att MBCD användes som lösningsmedel är att steroler lösta i MBCD har visats ge större omsättning än om de löses med detergent (Pettersson et al., 2013). Att inhiberingen med tomatidin verkligen beror på en brist av essentiella steroler gick inte att visa, men tidigare studier med tomat och jästsvamp har konstaterat att sterolsyntesen blockeras på grund av att tomatidin inhiberar STEROL METHYLTRANSFERASE2 (SMT2) (Itkin, et al., 2011) (Simons, o.a., 2006). Tillsats av IAA, NAA och GA3 gav heller ingen signifikant ökning av rottillväxten jämfört med enbart tomatidin (Figur 6). Utebliven cellsträckning verkar inte bero på någon brist eller blockering av biosyntesen av dessa hormon i rotspetsen, givet att de togs upp av rötterna vid komplementeringen. Försök skulle eventuellt kunna upprepas med fler koncentrationer av hormonerna.

Groningsförsöket visade att groningen inte påverkas direkt av tomatidin, utan snarare indirekt genom att tillväxten hämmas (Tabell 2). Försöket innefattade relativt få frön per behandling och av varierande kvalitet (Bilaga 1). Det uppstod vissa problem med ojämn fuktighet i trägen och svampinfektioner som kan ha påverkat resultatet. För alla arter utom lin varierade groningen utan avseende på tomatidinkoncentration. Försöken kan därför göras om under mer standardiserade former; till exempel sterilt på MS-medium.

6 Slutsats

I denna studie visades det att tomatidin verkar allelopatiskt (Figur 2 och Figur 3). Tomatidin inhiberade primärt rottillväxt men inte groning, rotmassa eller bladmassa. Den starka inhiberande effekten var specifik för tomatidin och kan ej tillskrivas de övriga 8 alkaloiderna från potatisväxter som testades (Figur 2, A). Effekten av tomatidin beror på en primär inhibering av rotcellers elongering. Tillsats av steroler eller växthormoner komplementerade inte rottillväxten men MBCD, som steroiderna löstes i, gjorde detta (Figur 4 och Figur 6).

För att vidare undersöka bakomliggande orsak till tomatidins allelopatiska effekt kan extraktion av steroler från växtmaterial som odlats med tomatidin vara intressant för att se om det går att upprepa och styrka resultat från tidigare studier (Itkin, et al., 2011). Försök med mutanta arabidopsis utan SMT1 eller SMT2 och med tomatidin skulle även kunna göras för att värdera enzymernas roll i inhiberingen.

Tomatidins inhiberande effekt gör den teoretiskt möjlig som allelopatisk substans i tomatodling. Frågor som kvarstår är hur stor mängd tomatidin som återfinns i tomatens olika växtdelar och hur stor variationen är mellan olika sorter. Tomatidins stabilitet och koncentration i marken under en odlingssäsong är även okänd. Om målet är att öka tomatidinproduktionen i tomat måste även tomat tolerera högre nivåer utan att GAME1 omvandlar tomatidin till tomatin.

Referenslista

- Arnqvist, L., Dutta, P. C., Jonsson, L. & Sitbon, F., (2003). Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiology* 131(4), 1792-1799
- Benveniste, P., (2004). Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology* 55, 429-457
- Friedman, M., (2002). Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21), 5751-5780
- Friedman, M., McDonald, G. M. & Filadelfi-Keszi, M., (1997). Potato Glycoalkaloids: Chemistry, Analysis, Safety and Plant Physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16(1), 55-132
- González, V. T., Junttila, O., Lindgård, B. & Reiersen, R., (2015). Batatasin-III and the allelopathic capacity of *Empetrum nigrum*. *Nordic Journal of Botany* 33, 225–231
- Itkin, M. et al., (2011). GLYCOALKALOID METABOLISM1 is required for steroidal alkaloid glycosylation and prevention of phytotoxicity in tomato. *The Plant Cell* 23(12), 4507-4525
- Jabran, K., Mahajan, G., Sardana, V. & Chauhan, B. S., (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection* 72, 57-65
- Marinov-Serafimov, P., (2010). Determination of allelopathic effect of some invasive weed species on germination and initial development of grain legume crops. *Pesticides and phytomedicine* 25(3), 251-259
- Medina, J. et al., (2012). Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* 139(10), 1253-1265
- Mithöfer, A. & Boland, W., (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology* 63, 431-450
- Patel, K., Singh, R. B. & Patel, D. K., (2013). Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. *Journal of Acute Disease* 2(2), 92-98
- Petersson, E. V. et al., (2013). Conversion of exogenous cholesterol into glycoalkaloids in potato shoots, using two methods for sterol solubilisation. *PloS one*, 8(12), e82955
- Roddick, J. D., (1979). Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. *Phytochemistry* 18, 1467-1470
- Sabh, A. Z. E., & Ali, I. H. H. (2010). Allelopathic activity of nightshade (*Solanum nigrum* L.) on seedling growth of certain weeds and crops. *Annals of Agricultural Science*, 55(1), 87-94
- Simons, V. et al., (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(8), 2732–2740
- Taiz, L. & Zeiger, E., (2006). *Plant physiology*. 6:e upplagan red. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Tisdale, S. L., Nelson, W. L. & Beaton, J. D., (1985). *Soil fertility and fertilizers*. 4:e upplagan red. New York, London: Collier Macmillan Publishers.
- Åkesson, O., (2014). *Blötläggning och aktivering av frön före sådd*. Sveriges lantbruksuniversitet: Institutionen för växtbiologi/Agronomprogrammet, mark/växt.

Bilagor

Bilaga 1. Antal sådda frön av varje art till groningsförsök.

Växt	Tomatidin (μM)			
	Kontroll	0,1	1	5
Arabidopsis	270	200	220	300
Blåklint	30	30	30	30
Havre	20	20	20	20
Lin	20	20	20	20
Rädisa	20	20	20	20
Sockermajs	20	20	20	20
Solros	20	20	20	20
Spenat	20	20	20	20
Tomat	20	20	20	20
Vallblandning	110	130	190	350
Vete	20	20	20	20