

Stir Bar Sorptive Extraction – Eine Methode zur Bestimmung von volatilen Inhaltsstoffe der Kartoffelpflanzen?

Stir Bar Sorptive Extraction – A method for detection of volatiles from potato plants?

Beyer, K.¹, Ziegler, A.¹, Ulrich, D.², Weiß, K.², Grünwald, R.¹, Wilhelm, R.¹

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,

¹Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen,

²Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz,

Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg,

Kontakt: ralf.wilhelm@jki.bund.de

Zusammenfassung

Die Anwendung der Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) als Methode zur Extraktion von emittierten volatilen Substanzen von Kartoffelblättern für die Bestimmung mittels GC/MS wird untersucht. Es soll eine effiziente Methode entwickelt werden, die zur Darstellung von sortenbedingten Unterschieden im Spektrum der volatilen Substanzen bei Kartoffelpflanzen geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass SBSE Nachweise gestattet, die bei geringerem Aufwand mit bekannten Methoden vergleichbar sind. Weitere Untersuchungen dienen der Optimierung der Methodik. Ziel ist es, das Spektrum der volatilen Stoffe als Parameter für eine Bewertung von Sorten (z.B.: Pflanzengesundheit, Pflanzenschutz, Biosicherheit) heranzuziehen.

Stichwörter: Sesquiterpene, GC/MS, Kartoffel

Abstract

The application of Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) as a method for extraction of emitted volatile compounds of potato leaves using GC/MS will be studied. A suitable efficient method shall be developed to describe differences in the spectrum of volatile compounds of potato varieties. It was shown that SBSE yields results similar to other established methods but with less effort. The method will be optimised further. The use of the spectrum of volatile compounds as a parameter for variety assessment (e.g.: plant health, plant protection, biosafety) is planned.

Keywords: sesquiterpene, GC/MS, potato

Einleitung

Volatile Substanzen sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die mit der Umwelt der Pflanze wechselwirken. Unter diesen Substanzen stellen die Terpenoide (Mono- und Sesquiterpene) eine bedeutende Gruppe dar. Sie sind Signalstoffe (Semiochemicals) bei der Kommunikation der Pflanzen mit Insekten (Herbivoren, Carnivoren).

Die Zucht von Kulturpflanzen greift in den Pflanzenstoffwechsel ein. Ungezielte bzw. indirekte Veränderungen in der Synthese von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden oft jedoch nicht berücksichtigt, ökologische Auswirkungen bleiben unklar. Bei der Sicherheitsbewertung von transgenen Pflanzen spielt gerade die Abschätzung der ökologischen Folgen eine wichtige Rolle. Die Wirkung transgener Pflanzen auf Nichtzielorganismen oder Fragen der Pflanzengesundheit sind zu berücksichtigen. Ist die ökologische Relevanz der Wirkungen von volatilen Substanzen bekannt, können diese prinzipiell zur Sicherheitsbewertung, aber auch zur züchterischen Optimierung herangezogen werden. Dies setzt voraus, dass die natürliche Variationsbreite der Stoffe, deren Funktion und Nutzen für die landwirtschaftliche Praxis quantifiziert werden können. Für die Bearbeitung der Fragestellung wird eine effiziente Methodik benötigt. Die Analyse von volatilen Pflanzeninhaltsstoffen erfolgt bisher häufig mit Versuchsansätzen, bei denen die Anzahl von parallelen Messungen durch den hohen Aufwand stark begrenzt ist. Die SBSE hingegen bietet die Möglichkeit einer schnellen und aufschlussfreien Extraktion von flüchtigen Substanzen in gasförmigen Proben, wie z.B. im

Headspace von Pflanzenmaterial. Unter Verwendung der SBSE und anschließender Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/ MS) wird eine Methode entwickelt, die reproduzierbare Ergebnisse zur Darstellung des Spektrums von volatilen Stoffen liefert. Die Versuche werden mit *Solanum tuberosum* durchgeführt.

Material und Methoden

Bei der SBSE werden mit einer Sorptionsphase (Polydimethylsiloxan-PDMS) beschichtete Rührstäbchen der Firma Gerstel, auch „Twister“ genannt, verwendet. *Twister* von 10 mm Länge und einer PDMS Schichtdicke von 0,5 mm werden zusammen mit Pflanzenblättern in Glasgefäße gebracht und mehrere Stunden belassen. Das Prinzip der Extraktion beruht auf einer Gleichgewichtseinstellung für jede volatile Substanz zwischen PDMS-Schicht und Probenvolumen. Anschließend werden die am *Twister* gebundenen Stoffe thermisch bei 250 °C desorbiert und der GC/ MS zugeführt. Zur Stofftrennung wird eine polare Säule (HP INNOWax, 0,25 mm ID x 30 m Länge und 0,5 µm Schichtdicke) verwendet. Das Trägergas ist Helium (1,1 ml/min).

Die ersten Versuche wurden mit 20 ml Glasröhrchen durchgeführt. In jedes Glasröhrchen kam zusammen mit dem *Twister* ein abgeschnittenes Seitenfiederblättchen der Kartoffelpflanze. Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur über 24 Stunden. Die verwendeten Kartoffelpflanzen wurden aus *in vitro* vermehrtem Material herangezogen. Die Anzucht erfolgte in handelsüblicher Pflanzenerde in der Klimakammer bzw. im Gewächshaus.

Ergebnisse und Diskussion

Mit der SBSE Methode konnten bei den ersten Versuchen in zwei Kartoffelsorten (Cascada und Hermes) 19 Sesquiterpene nachgewiesen werden, was qualitativ mit bisherigen Ergebnissen anderer Methoden vergleichbar ist (Tabelle 1). Karlsson et al. (2009) konnten mehr als 30 und Weissbecker et al. (2000) 14 emittierte Sesquiterpene bei den Kartoffelsorten Princess bzw. Surprise identifizieren. Bei beiden Versuchsaufbauten wurden die Kartoffelpflanzen in geschlossenen Gefäßen platziert, das heißt die Pflanzen sind künstlichen Bedingungen bei der Beprobung ausgesetzt. Aus dem über die Pflanze geleiteten Luftstrom wurden die volatilen Stoffe an einer Festphase gesammelt/aufkonzentriert. 17 der 30 von KARLSSON et al. (2009) identifizierten Sesquiterpene wurden auch unter Verwendung der SBSE bei Blättern der Kartoffelsorten Cascada und Hermes gefunden (Tabelle 1). SZAFRANEK et al. (2005) konnten 19 Sesquiterpene bei 10 polnischen Sorten identifizieren, wobei das Blattmaterial mit Lösungsmittel extrahiert wurde. Keine der Methoden kommt bei den Probenahmen ohne Manipulation am Pflanzenmaterial aus. Auch das Abschneiden der Blätter bei unserer Methode stellt eine mechanische Beschädigung dar, die Einfluss auf die Emission von volatilen Stoffen bei Pflanzen haben kann. Der Vorteil der SBSE gegenüber den „klassischen“ Methoden ist der wesentlich geringere Aufwand. Dies ermöglicht eine parallele Beprobung von mehreren Pflanzen. Durch die einfache Handhabung sind sogar Beprobungen von Freilandpflanzen möglich.

Die 5 Sesquiterpene β -Caryophyllen, Germacren D, E- β -Farnesen, β -Sesquiphellandren und α -Bergamoten treten bei allen untersuchten Kartoffelsorten auf. Alle haben Bedeutung bei der Kommunikation der Pflanzen mit Insekten (Lockstoff, Repellent) oder der Kommunikation von Insekten untereinander (Pheromon, Alarmstoff: <http://www.pherobase.com>). Die Optimierung der Methodik und die Eingrenzung der Fehler(quellen) standen und stehen bei den nächsten Versuchen im Vordergrund. Zur Erhöhung des Probenvolumens an Pflanzenmaterial wurden verschiedene Gefäßvarianten getestet und 100 ml Weithals-Standflaschen mit Normschliff und Glas-Deckelstopfen ausgewählt. Dies ermöglicht die Arbeit mit Mischproben von mehreren Blättern. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, laufen Versuche zur Anzucht der Kartoffelpflanzen in *Perlite*.

Tab. 1 Identifizierte Sesquiterpene (x) von Kartoffelblättern und Vergleich mit Angaben aus verschiedenen Literaturquellen

Sorte	Karlsson et al. (2009)			Szafranek et al. (2005)	Weissbecker et al. (2000)
	Cascada	Hermes	Princess	10 polnische Sorten	Surprise
Sesquiterpene					
β -Caryophyllene	x	x	x	x	x
α -Caryophyllene	x	x	x		
Caryophyllene oxide	x	x	x		x
Germacrene D	x	x	x	x	x
E- β -Farnesene	x	x	x	x	x
β -Sesquiphellandrene I	x	x			
β -Sesquiphellandrene II + Z- β -Farnesene	x	x			
β -Sesquiphellandrene III	x	x			
β -Sesquiphellandrene			x	x	x
α -Bergamotene	x	x	x	x	x
β -Bisabolene	x	x		x	
α -Zingiberene	x	x	x		x
α -Gurjunene	x	x	x	x	
Ledol	x	x	x		x
α -Cubebene	x	x	x	x	
β -Cubebene	x	x	x	x	
β -Elemene	x	x	x	x	
γ -Elemene	x	x			
γ -Muurolene	x	x	x		
δ -Cadinene	x	x	x		
α -Cadinene	x	x	x		
β -Bourbonene	x		x		
sonstige	n.n.	n.n.	+ 15	+ 9	+ 6

n.n. nicht nachgewiesen, Substanzidentifikation: NIST Bibliothekssuche

Der Einfluss der Lagerungsdauer von beladenen *Twistern* wird untersucht indem die Twister bis zu 14 Tage im Kühlschrank bei 5 °C gelagert werden. Ferner soll die Sorptionszeit verkürzt werden (1h, 3h, 6h), um die Flexibilität der Methode zu erhöhen und die experimentellen Möglichkeiten zu erweitern.

Für zukünftige Untersuchungen wurden 30 Kartoffelsorten nach der Bundessortenliste auf Grund ihrer Virus- und Nematodenanfälligkeit ausgewählt und das Pflanzmaterial bereitgestellt.

Nach Abschluss der Versuche zur Methodik werden die Spektren der volatilen Substanzen (Sesquiterpene) der ausgewählten Kartoffelsorten bestimmt. Wenn sich durch die Methode sortenbedingte Unterschiede darstellen lassen, sind Voraussetzungen für die weiteren Untersuchungen des Zusammenhangs von physiologischen Sorten-Merkmalen mit möglichen ökologischen Auswirkungen gegeben (functional metabolomics).

Literatur

- Szafranek, B., K. Chrapkowska, M. Pawinska, J. Szafranek (2005): Analysis of Leaf Surface Sesquiterpenes in Potato Varieties. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2817-2822.
- Weisbecker, B., J.J.A. Vanloon, M.A. Posthumus, H.J. Bouwmeester, M. Dicke (2000): Identification of volatile potato sesquiterpenoids and their olfactory detection by the two-spotted stinkbug. *J.Chem. Ecol.* **26** (6), 1433-1445.
- Karlsson, M.F., G. Birgersson, A.M. Cotes Prado, F. Bosa, M. Bengtsson, P. Witzgall (2009): Plant Odor Analysis of Potato: Responses of Guatemalan Moth to Above- and Belowground Potato Volatiles. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 5903-5909.