



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Stress response and health affecting compounds in Brassicaceae

Jahangir, M.

Citation

Jahangir, M. (2010, May 20). *Stress response and health affecting compounds in Brassicaceae*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15518>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15518>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary of the Thesis

Vegetables have always been considered as healthy food. *Brassica* vegetables are well known all over the world as a common food containing health affecting compounds (**Chapter 2**). A vast amount of data is available for health promoting compounds in Brassicaceae vegetables. These health promoting affects are due to a range of phytochemicals including primary (carbohydrates, amino acids and organic acid) and secondary metabolites (phenolics and glucosinolates), along with vitamins and minerals. These metabolites are interconnected through different biosynthetic pathways and are affected by different external stimuli. Plant metabolic responses are specific for different kinds of stress, but use in part similar metabolic pathways (**Chapter 3**). Certain internal or external factors play an important role for the metabolite profile of vegetables, thus changing the nutritional value for human (**Chapter 4**). These factors are related to the plant response to external stress factors (**Chapter 5, 6, 7**), helping the plant to survive. The aim of this thesis was to study the *Brassica* phytochemicals and their response to stress factors by using a holistic analytical approach.

General overview of stress induced metabolomic response of Brassicaceae

A significant quantitative metabolomic variation among different species of *Brassica* is reported, showing a nutritional distinction of these species. During growth and development, the plant has to cope with a number of stress factors. These include attack of animals, insects, pathogens, and/or metal, UV, temperature, and drought stress. These external stimuli or the internal physiological growth regulation is known to lead to the inactivation or enhancement of various metabolic pathways resulting in qualitative and/or quantitative changes in plant metabolite production. In nature plants are exposed to multiple stresses at the same time, so there is natural selection pressure for them to evolve coordinated rather than conflicting defence mechanisms²⁴⁷ (**Chapter 3**).

Although an enhancement of secondary metabolite production is observed when plants are under stress, this change seems specific in terms of the type of interaction. It might depend on the nature of stimuli and/or invading microorganism, that could specifically activate or suppress gene expression and induce or block specific sites of a metabolomic pathway, or even result in catabolism of the plant defence compounds (**Chapter 5, 6**).

Metabolomic assessment of *Brassica rapa* (va. raapstelen) and *Raphanus sativus* L.

Brassica rapa (var. raapstelen) and *Raphanus sativus* (red radish) are well known model systems in recent plant research. Metabolomic data can be misleading if not all the factors affecting the plant growth are taken into consideration. The concentration of primary and secondary metabolites is also dependent on the plant age.²⁸ Metabolomic variation during the three developmental stages has been assessed (**Chapter 4**). Metabolomic characterisation was done by following a two way analytical approach, i.e. a non targeted metabolomic study by NMR, and a targeted study of certain metabolites by HPLC. All the results either by NMR or HPLC were statistically analyzed by PCA, showing metabolomic changes for both species at different growth stages. Amino acids, organic acids, chlorophyll, carotenoids, tocopherols, ascorbic acid, sucrose, phenylpropanoids and glucosinolates are evidently the discriminating metabolites in this study. In plant species, the metabolomic variation is both spatial and temporal, and different trends under similar conditions may be observed for the species (**Chapter 4**). These results confirm the change in plant metabolomic pool with respect to increase in plant age previously reported by our group.²⁸

Metabolomic response of *Brassica* to preharvest bacterial contamination

An inducible cell defence response activates different metabolomic pathways leading to altered production of certain primary and/or secondary metabolites in *Brassica*. These plant self-protective responses,³⁹² are activated upon recognition of signal molecules from pathogens³⁹¹ or the stimuli from the chemical environment.³⁵²

Although the interaction of plants to plant pathogens is extensively studied, this is not the case for interaction with human pathogens, which may spread in the environment, especially in land irrigated directly or indirectly by drainage / sewage water. In this scenario we cannot exclude the possibility of the interaction of these microbes with vegetables, even if visual symptoms for this interaction cannot be observed. In order to investigate *Brassica* interaction with typically foodborne bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*, ¹H NMR in combination with PCA and PLS-DA treatment of the data

was applied to *B. rapa* which had been subjected to these pathogens (**Chapter 5**).

A microbial class (gram-positive and gram-negative) dependent response of *B. rapa* was easily seen by PCA analysis and even by a visual comparison in case of differentially treated plant samples. A higher production of secondary metabolites was observed in the plants under stress by bacteria. Specifically notable is the higher production of GABA in *Bacillus* infested plants, while generally higher amount of phenolics were observed in bacterial infected plants as compared with control and blank. A systemic induced resistance thus to be induced by the bacteria. Generally threonine and γ -amino butyric acid (GABA) were found to be the discriminating metabolites in gram-positive bacteria treated plants, as compared with those treated with gram-negative bacteria that on the other hand exhibited a significant increase in sinapoyl malate, caffeoyl malate and histidine (**Chapter 5**). In case of microorganisms certain volatiles are produced that play a pivotal role in SAR, especially in case of *Bacillus spp.* it is quite clear from the literature that 2,3-butandiol, produced by these bacteria plays an important role in systemic induced resistance of plants. Such microbial volatiles may trigger certain biochemical changes in primary and secondary metabolism of plants, causing elicitation of plant defence.³⁹⁰

Metabolomic response to metal stress

Rapid industrial development along with extreme changes in atmospheric conditions around the globe made the environment threatening for plant development because of contaminated air and soil. In these circumstances, plants may have to deal with high concentration of metal ions, resulting in changes in plant metabolism.⁴¹¹ This metabolomic alteration results in the activation of multiple metabolomic ways, by varying the activity and quantity of key enzymes of different metabolomic pathways.⁴¹¹ Apparently this response of plant to stress is observed in the both leaves and roots.⁴¹²

Results of the present study indicate that plants grown in higher levels of metal ionic conditions increase the production of amino acids, phenolics and glucosinolates. Among these amino acids and phenolics are reported to have a metal chelating effect²⁷⁵ indicating that the observed increase in amino acids and phenylpropanoids might be a detoxification response of the plant. However, high metal concentrations (500 mmol) produced a decrease in primary and secondary metabolites as

compared with moderate concentrations (50 mmol & 100 mmol) which might point to an adverse effect of metal ions on primary and secondary metabolism due to the toxic effect of metals at high concentrations (**Chapter 6**).

Metabolomic response to post harvest storage time and temperature

Vegetables travel long ways from field to cooking pan. The preharvest growth conditions are known to severely affect the plant metabolome, but postharvest storage conditions also play a crucial role for the nutritional character of vegetables. During the storage period radish plants show an increase in glucosinolates and phenolics with a subsequent decrease in these compounds during long term storage (**Chapter 7**). The decline of secondary metabolites might be due to the degradation of these products. This phenomenon depends on the storage time and temperature.^{11, 434} In postharvest storage of *Brassica* vegetables, either with the purpose of consumption or for experimental purposes, low temperature is known as an important factor. In our study, least metabolomic changes were observed in -80°C and -20°C , followed by 4°C and room temperature storage conditions. The samples stored at room temperature started to get spoiled after three days of storage. Samples stored at 4°C were still looking fresh after 28 days storage time, although yellowing of leaves was visible. Samples stored at -20°C and -80°C remained unchanged.

Brassicaceae vegetables are consumed all over the world. The presence of a range of phytochemicals (amino acids, glucosinolates, flavonoids, vitamins and mineral nutrients), made these vegetables as an important source of food for humans and animals. The response of *Brassicaceae* metabolites to preharvest and postharvest factors was studied by using a systems biology approach. It is observed that different environmental, storage and/or growth factors induce metabolic responses in terms of changes of primary and/or secondary plant metabolites profiles. It is concluded that the aforementioned factors cause changes in plant metabolites finally leading to change in quality.

Samenvatting van de Thesis

Groenten zijn altijd beschouwd als gezond voedsel. Groenten van het genus *Brassica* worden over de hele wereld als voedsel gebruikt (**Hoofdstuk 2**). Veel kennis is inmiddels beschikbaar over de gezondheidsbevorderende stoffen in Brassicaceae groenten. Het gezondheidsbevorderende effect hangt samen met een reeks van primaire (koolhydraten, aminozuren en organische zuren) en secundaire metabolieten (fenolen en glucosinolaten), samen met vitaminen en mineralen. De productie van deze metabolieten is met elkaar verbonden in biosynthetische netwerken en wordt beïnvloed door verschillende externe stimuli. Metabole reacties van de plant hierop zijn specifiek voor verschillende soorten van stress, maar gebruiken voor een deel vergelijkbare metabole routes (**Hoofdstuk 3**). Zowel interne als externe factoren spelen een belangrijke rol voor de metabolietenprofielen van groenten, en veranderen daarmee de voedingswaarde voor de mens (**Hoofdstuk 4**). Met name externe stressfactoren beïnvloeden het metabolisme van de plant (**Hoofdstuk 5, 6, 7**). Dit hangt samen met de overleving van de plant in zijn omgeving. Het doel van dit proefschrift was om de fytochemicaliën in *Brassica* te onderzoeken, met name in relatie tot de reactie van de plant op stressfactoren, gebruikmakend van een holistische analytisch-chemische benadering.

Algemeen overzicht van stress-geïnduceerd metabolisme in Brassicaceae

Er zijn duidelijk kwantitatieve en kwalitatieve metabole verschillen tussen verschillende *Brassica*-soorten en variëteiten, die daarmee ook een verschil in voedingswaarde hebben. Tijdens de groei en ontwikkeling heeft de plant te kampen met een aantal stressfactoren. Deze omvatten herbivorie door dieren en insecten, ziekteverwekkers, omgevingsfactoren zoals metalen uit de bodem, UV-straling, temperatuur en droogtestress. Van het effect van deze externe prikkels op de interne fysiologische groeiregulatie is bekend dat ze leiden tot het verhogen of verlagen van de flow door verschillende metabole routes, resulterend in kwalitatieve en/of kwantitatieve veranderingen in de metabolietproductie. In de natuur zijn planten tegelijkertijd blootgesteld aan meervoudige stressfactoren, hetgeen resulteert in een continue natuurlijke selectiedruk die leidt tot de evolutie van gecoördineerde afweermechanismen (**Hoofdstuk 3**).

In het algemeen wordt een verhoging van de productie van secundaire metabolieten waargenomen bij planten onder stress, en deze verandering blijkt specifiek te zijn voor de aard van de interactie. De verschillen hangen af van de aard van de stimuli en/of type van micro-organismen of herbivoren die specifiek genexpressie induceren of onderdrukken en daarmee de bijbehorende metabole routes. Katabolisme van de plantenafweerstoffen bij infectie door microorganismen kan ook een rol spelen (**Hoofdstuk 5, 6**).

Metabole veranderingen in *Brassica rapa* (raapstelen Va) en *Raphanus sativus* L

Brassica rapa (var. raapstelen) en *Raphanus sativus* (rode radijs) zijn bekende modelsystemen in plantenonderzoek. Voordat onderzoek gedaan kan worden naar veranderingen in het metaboloom (het metabolietenprofiel) onder verschillende experimentele condities moet men de veranderingen in het metaboloom kennen tijdens de ontwikkeling van de plant. De verschillen in het metaboloom in drie ontwikkelingsstadia van de plant zijn daarom eerst bepaald voordat verschillende experimenten uitgevoerd werden (**Hoofdstuk 4**).

Het metaboloom werd gemeten met twee verschillende analytisch-chemische benaderingen, een niet-gerichte analyse met behulp van NMR, en een op bepaalde metabolieten gerichte analyse met HPLC. Alle resultaten, van zowel NMR als HPLC zijn met behulp van multivariaatanalyse bewerkt, waarmee metabole veranderingen voor beide soorten in verschillende groeifasen in kaart zijn gebracht. Amino-zuren, organische zuren, chlorofyl, carotenoïden, tocoferolen, ascorbinezuur, sucrose, fenypropa-noïden en glucosinolaten zijn de discriminerende metabolieten. Metabole verschillen zijn er zowel in ruimte (deel van de plant) als tijd, en er kunnen onder vergelijkbare condities verschillende trends worden waargenomen voor soorten (**Hoofdstuk 4**). De gevonden resultaten bevestigen eerdere resultaten van ons onderzoek naar verandering van het plantenmetaboloom tijdens de groei.

Metabole reactie van *Brassica* op “pre-harvest” bacteriële besmetting

Wanneer de afweer van een cel wordt geïnduceerd dan resulteert dat in het activeren van verschillende biosynthesewegen van primaire en/of secundaire metabolieten in *Brassica*. De afweerreactie wordt geïnduceerd door signaalmoleculen uit de plant zelf, uit pathogenen of

herbivoren, maar het is ook mogelijk dat chemische signalen uit de omgeving deze reactie kunnen opwekken.

De interactie van planten met plantpathogene microorganismen is in het verleden uitgebreid bestudeerd, maar dit is niet het geval voor interactie met menselijke pathogenen. Deze kunnen zich verspreiden in het milieu, met name in een veld dat wordt geïrrigeerd met water waar riool op geloosd is. In dat geval kan niet uitgesloten worden dat deze microben groenten besmetten. Mogelijkerwijs kan een dergelijke besmetting leiden tot een afweerreactie van de plant. Om dit te onderzoeken werd *Brassica* behandeld met bacteriën zoals *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* en *Shigella flexneri*, die via voedsel overgedragen worden. Het effect van een dergelijke behandeling op *Brassica rapa* werd met ^1H -NMR in combinatie met multivariate data-analyse van de gegevens onderzocht (**Hoofdstuk 5**).

Een van de microbiële klasse (Gram-positieve/Gram-negatieve) afhankelijke reactie van *B. rapa* was duidelijk te zien in de PCA-analyse en zelfs door een visuele vergelijking van verschillend behandelde planten. Een hogere productie van secundaire metabolieten werd waargenomen in de planten onder stress door de bacteriën. Met name opvallend is de hogere productie van GABA in door *Bacillus* aangetaste planten, terwijl in het algemeen hogere concentraties van fenolen werden waargenomen bij de geïnfecteerde planten in vergelijking met de controle en blanco. De humane pathogene bacteriën induceren dus een systemische afweerreactie in de plant.

Threonine en γ -aminoboterzuur (GABA) zijn de discriminerende metabolieten die verhoogd zijn in met Gram-positieve bacteriën behandelde planten, in het geval van Gram-negatieve bacteriën zijn het sinapoylmalaat, caffeoylmalaat en histidine (**Hoofdstuk 5**). Micro-organismen kunnen bepaalde vluchtige stoffen produceren die een cruciale rol spelen in de systemische afweer, met name in het geval van *Bacillus* spp. is het bekend dat 2,3-butaandiol wordt geproduceerd dat een belangrijke rol speelt in geïnduceerde systemische resistentie van planten. Dergelijke microbiële vluchtige stoffen kunnen leiden tot biochemische veranderingen in het primair en secundair metabolisme van planten, als onderdeel van de afweerreactie van de plant.

Metabole reactie op stress met metaalionen

Snelle industriële ontwikkelingen, samen met veranderingen in atmosferische omstandigheden over de hele wereld zijn een bedreiging voor de groei van planten, onder andere als gevolg van de verontreinigde lucht en bodem. Planten moeten zich dan ook vaak aanpassen aan hoge concentraties van metaalionen, wat resulteert in veranderingen in het plantenmetabolisme. De metabolome verandering wordt veroorzaakt door veranderingen in genexpressie die leiden tot veranderingen in de activiteit van enzymen in biosynthesewegen. Deze verandering onder stress met metaal-ionen wordt waargenomen in zowel de bladeren als de wortels.

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat in planten bij hogere metaalionconcentraties de productie van aminozuren, fenolen en glucosinolaten verhoogd is. Deze aminozuren en fenolen hebben mogelijk een metaalion-chelaatvormend effect en kunnen dus een rol spelen in de ontgiftingsreactie van de plant. Een hoge concentratie van metalen (500 mmol) resulteerde in een daling van de primaire en secundaire metabolieten in vergelijking met lagere concentraties (50 mmol & 100 mmol). Dit zou kunnen wijzen op een negatief (toxisch) effect van metaalionen op het primaire en secundaire metabolisme (**Hoofdstuk 6**).

Metaboloomveranderingen tijdens opslag na oogsten

Groenten leggen een lange weg af van het veld naar de pan. Van de groeicondities is het bekend dat zij het plantenmetaboloom bepalen, maar ook de bewaarcondities na het oogsten spelen een cruciale rol voor het metaboloom en dus de voedingswaarde van groenten. Tijdens de opslag van radijsplanten blijkt er eerst een toename van de glucosinolaten en fenolen te zijn, maar bij langere opslag dalen de gehaltes weer (**Hoofdstuk 7**). De daling van secundaire metabolieten zou te wijten kunnen zijn aan de afbraak van deze producten. Dit fenomeen hangt af van de opslagtijd en temperatuur. Voor het bewaren van *Brassica*-groenten, voor consumptie of voor experimentele doeleinden, zijn lage temperaturen bekend als een belangrijke factor. In onze studie werden de minste metabolome veranderingen waargenomen bij -80°C en -20°C , gevolgd door 4°C en kamertemperatuur. De bij kamertemperatuur bewaarde monsters beginnen te bederven na drie dagen van opslag. Monsters bewaard bij 4°C leken nog steeds vers na 28 dagen opslag, hoewel geelverkleuring van de bladeren zichtbaar was. Opslag bij -20 en -80°C geeft geen visuele veranderingen, alleen na het ontdooien is het

materiaal niet meer geschikt als groente. Voor analyse is deze bewaarwijze echter de meest geschikte.

Brassicaceae groenten worden gebruikt over de hele wereld. Het spectrum aan fytochemicaliën (aminozuren, glucosinolaten, flavonoïden, vitamines en minerale voedingsstoffen) maken van deze groenten een belangrijke bron als menselijke en dierlijke voeding. Daarom is de reactie van het metabolisme in Brassicaceae planten op verschillende condities voor en na oogsten onderzocht met behulp van een systeembioologische benadering.

Verschillende milieu, opslag-en groeifactoren induceren verschillende veranderingen in zo wel primaire en secundaire stofwisseling van de planten. De bovengenoemde factoren kunnen daarmee ook veranderingen veroorzaken in de gehalten van de belangrijke nutrienten, en daarmee dus de kwaliteit van de groente beïnvloeden.