

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22118> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Nuringtyas, Tri Rini

Title: Pyrrolizidine alkaloid variation in *Jacobaea* plants : from plant organ to cell level

Issue Date: 2013-11-06

Samenvatting en Discussie

Planten bevatten veel verschillende secundaire metabolieten (SM's). Diversiteit van SM's vinden we op alle nivo's: tussen soorten, binnen soorten, tussen planten van een soort en tussen weefsels en cellen van een individu. Het onderzoek in de proefschrift richt zich op de rol van de diversiteit van SM's in de verdediging van planten tegen herbivoren.

Pyrrolizidine alkaloiden (PA's) in soorten van het geslacht *Jacobaea* werden gekozen als systeem om deze diversiteit te bestuderen. PA's zijn bekende gifstoffen voor de meeste gewervelde herbivoren en generalistische fytofage insecten. Er zijn grote verschillen in concentraties en samenstelling van PA's binnen een plantensoort.

In hoofdstuk 1 wordt de huidige kennis over de diversiteit in PAs, synthese en toxiciteit besproken. Bovendien worden de methoden die in deze studie gebruikt zijn, zoals Nuclear Magnetic Resonance (NMR) metabolomics en laser microdissectie (LMD), geïntroduceerd.

Hoofdstuk 2 beschrijft de invloed van endofytische schimmels op PA diversiteit. *Jacobaea* planten werden behandeld met drie verschillende fungiciden (Folicur, Pronto Plus en Switch). Na behandeling met Pronto plus en Switch waren de planten vrij van endofytische schimmels. In de met Folicur behandelde planten vonden we onverwacht een endofytische schimmelsoort die een sterke homologie vertoonde met het geslacht *Glomus*, een mycorrhiza behorende tot de Glomeromycota. Alle planten, zowel met als zonder fungicide behandeling, synthetiseerden PA's. Dit geeft aan dat endofyten niet onmisbaar zijn voor PA productie. De met Folicur behandelde planten hadden een lager PA gehalte dan de onbehandelde controlegroep terwijl de planten met de andere twee fungicide behandelingen niet verschilden van de controle groep. Vooral lagere concentraties van senecionine- en jacobine-achtige PA's veroorzaakten een daling van het PA gehalte.. Dit resultaat bevestigde dat de biotische omgeving bijdraagt aan variatie in PA concentratie en compositie in *Jacobaea* planten. Het is vooralsnog onduidelijk hoe de aanwezigheid van deze endofytische schimmel de PA concentratie verlaagt. De verlaagde jacobine gehalten kunnen belangrijke ecologische consequenties hebben omdat ze enerzijds de plant resistentier kunnen maken tegen generalistische herbivoren (hoofdstuk 5) en anderzijds de planten aantrekkelijker kunnen maken voor specialistische herbivoren.

Er is nog weinig onderzoek gedaan naar de mate waarin verschillende plantenorganen PA's kunnen synthetiseren en transformeren. De PA synthese is door Hartmann et al. (1989) vergeleken tussen bloeiende planten waarvan de wortels waren verwijderd en in-vitro wortelkweken. In hoofdstuk 3 is beschreven hoe we weefsel kweken van wortels, spruiten en complete planten gebruikten om de PA synthese te bestuderen. Spruiten konden PA's de novo synthetiseren. Dit is in tegenspraak met eerdere studies die veronderstelden dat PA's alleen geproduceerd worden in de wortels

(Hartmann en Toppel, 1987). De PA concentraties waren laag in de wortelkweken, gemiddeld in de spruitkweken (1,5 x de wortelkweken) en hoog in kweken van complete planten (3 x de wortelkweken). Dit geeft aan dat zowel wortels als spruiten belangrijk zijn voor PA synthese. De wortelkweken bevatten voornamelijk senecionine- en otosenine-achtige PA's terwijl jacobine- en erucifoline-achtige PA's in hogere concentraties aanwezig waren in zowel spruitkweken als kweken van complete planten. Onetine concentraties was twee maal zo hoog in de wortelkweken dan in de spruitkweken kweken van complete planten. Dit suggereert dat de wortelkweken retronecine kunnen transformeren tot de otonecine basisstructuur. De hoge niveaus van jacobine- en erucifoline-achtige PA's in de spruitkweken en kweken van complete planten geven aan dat de epoxidatie die leidt tot een cyclische ether ring in de necic acid (necicine zuur) structuur van PA's vooral voorkomt in de bovengrondse organen. Spruiten zijn dus essentieel voor de diversificatie van jacobine- en erucifoline-achtige PA's.

In studies met celkweken van de generalistische insect herbivoor *Spodoptera exigua*, bleken jacobine en erucifoline de meest toxische PA's (hoofdstuk 6). De jacobine concentratie was hoog in planten die resistent waren tegen de trips *Frankliniella occidentalis* (hoofdstuk 5). Eerdere studies bevestigden de rol van jacobine-achtige PA's in de afweer van planten tegen herbivore insecten zoals trips, Leiss et al., 2009; Cheng et al., 2012) en van erucifoline-achtige PA's tegen bladluizen (*M. persicae*, Dominguez et al., 2008). In vergelijking met de effecten op insect herbivoren, is er weinig bekend over het effect van PA's op pathogenen. Een studie met zeven stammen van de genera *Fusarium* en *Trichoderma* toonde aan dat PA extracten de groei remden van pathogenen (Hol en Van Veen, 2002). Meer in-vitro studies naar de toxiciteit van de afzonderlijke PA's voor andere blad-herbivoren en pathogenen zijn van belang voor een beter begrip van de evolutie van PA diversiteit.

De route van de PA diversificatie is nog onduidelijk. In de literatuur zijn twee hypothetische scenario's voor de biosynthese voorgesteld. In het eerste scenario delen jacobine- en erucifoline-achtige PA's dezelfde biosyntheseroute met hetzelfde enzym dat verantwoordelijk is voor de transformatie van senecionine N-oxide, terwijl otosenine-achtige PA's onafhankelijk als derivaten van senekirine worden gevormd (hoofdstuk 2, Fig S.1A). In het tweede scenario worden jacobine- en erucifoline-achtige PA's onafhankelijk gesynthetiseerd terwijl otosenine-achtige PA's worden gevormd uit jacobine-achtige PA's (Pelser et al., 2005; hoofdstuk 2, Afb S.1B). In hoofdstuk 2 hebben we laten zien dat door de Follicur behandeling alleen de senecionine- en jacobine-achtige PA's, maar niet de erucifoline- en otosenine-achtige PA's werden beïnvloed. Deze resultaten geven aan dat de vorming van jacobine-achtige PA's onafhankelijk is van die van de erucifoline-achtige PA's zoals volgens het tweede scenario. Echter, de otosenine-achtige PA's passen waarschijnlijk beter in het eerste scenario omdat deze groep van PA's niet wordt beïnvloed door de behandeling. De resultaten van hoofdstuk 3 ondersteunen dit. De hoge hoeveelheid otosenine-achtige PA's in de wortelkweken in vergelijking met de spruitkweken maakt waarschijnlijk dat otosenine-achtige PA's, en speciaal onetine, niet worden gesynthetiseerd uit jacobine dat dezelfde necic acid groep heeft als onetine. We veronderstellen dat PA diversificatie een combinatie is van beide voorgestelde synthesesroutes waarbij de diversificatie in jacobine-achtige PA's onafhankelijk is van die van erucifoline-achtige PA's en de otosenine-achtige PA's zijn afgeleid van senecionine-achtige PA's en niet van jacobine-achtige PA's (Figuur S.1.C in hoofdstuk 2).

Grote insecten kunnen zich voeden met hele spruiten of bepaalde plantenorganen, maar kleinere insecten zullen zich voeden met vooral specifieke bladweefsels. Planten bezitten ongeveer veertig verschillende celtypen en twaalf ervan komen voor in het blad. De verschillende celtypen hebben hun eigen specifieke biologische functies in de groei, de ontwikkeling, de voortplanting en de verdediging van planten. Er is echter weinig informatie beschikbaar over de variatie van SM's tussen deze verschillende weefsels of celtypen. In hoofdstuk 4 gebruikten we NMR om de metaboliëtypen in epidermis en mesofyl te bestuderen. De epidermis bevatte een aanzienlijk grotere hoeveelheid jacaranone en fenylpropanoïden (vooral chlorogeenzuur en feruloyl kininezuur) terwijl het mesofyl hogere concentraties aan PA's bevatte. Chlorogeenzuur (CGA) en PA's zijn bekend om hun remmend effect op herbivoren zoals trips. Vóórdat trips geconfronteerd wordt met de PA's als de ultieme verdediging in de mesofyl komen tripsen eerst CGA tegen in de epidermis. Dus de twee cel lagen met hoge concentraties van twee verschillende soorten SM's met verschillende doeltreffendheid zou een strategie van de plant kunnen zijn om zich te verdedigen.

Om de metaboliëtypen van verschillende celtypen meer in detail te bestuderen voerden we een celspecifieke metabooloom studie uit met behulp van laser microdissection. We isoleerden epidermis- en palissade- en spons mesofylcellen van een trips resistent en een vatbaar genotype. De CGA concentratie was hoog in de epidermiscellen terwijl jacobine N-oxide vooral aanwezig was in de palissade mesofylcellen. Dit is in overeenstemming met de resultaten van hoofdstuk 4. In het genotype dat resistent was tegen trips vonden we een hogere concentratie van jacobine N-oxide maar geen hogere concentratie van CGA. Jacobine-achtige PA's zijn geassocieerd met verdediging van planten tegen generalistische herbivoren. Jacobine-achtige PA's kunnen echter ook gebruikt worden door specialistische insecten om hun waardplant te herkennen. Rupsen van de jacobsvlinder, *Tyria jacobaea*, de specialistische trips, *Haplothrips senecionis*, en de obligate biotrophe roest, *Puccinia lagenophorae*, werden allemaal vaker gevonden op genotypen met een hoog gehalte van jacobine-achtige PA's (Macel en Klinkhamer, 2010). De specifieke verdeling van jacobine N-oxide in de palissade mesofylcellen kan een strategie zijn om om te gaan met het generalist-specialist dilemma. Het concentreren van jacobine in de palissade cellen onder het bladoppervlak kan verhinderen dat jacobine wordt gebruikt voor gastheer herkenning door specialisten.

Het effect van jacobine (Leiss et al., 2009a; Cheng et al., 2011; Joosten, 2012) en van erucifoline op herbivoren is voornamelijk bestudeerd in correlatieve studies (Macel, 2003; Macel en Klinkhamer, 2010). De effecten van individuele PA's zijn niet getest in bioassays. We hebben daarom, in hoofdstuk 6, jacobine en erucifoline geïsoleerd uit *Jacobaea* chemotypen. We hebben de effecten van deze PA's evenals enkele andere commercieel verkrijgbare PA's waaronder senecionine, seneciphylline, retrorsine en senkirkine, in vrije base en N-oxide vorm getest op de generalistische herbivore *S. exigua*. Tegelijkertijd werd CGA individueel getest en in combinatie met de verschillende PA's. Twee soorten testen werden uitgevoerd: een met in vitro celweek van *S. exigua* en een met injectie van PA's in larven. In beide bioassays was jacobine de meest giftige PA terwijl senecionine en CGA niet toxisch waren. De combinatie van CGA met PA's verminderde de toxiciteit van PA's in alle gevallen. Voor alle PA's vertoonde de vrije base vorm een hogere activiteit dan de N-oxide vorm. Deze resultaten tonen aan dat naast de necine basis, de toxiciteit van PA's wordt beïnvloed door de functionele necic acid groep. Zowel, jacobine als erucifoline, de twee

meest toxische PA's, zijn retronecine macrocyclische di-esters met functionele epoxide groepen. Deze meer complexe necic acid groepen zijn resistenter tegen detoxificatie door esterasen en ze kunnen een verlaagde water oplosbaarheid hebben waardoor ze moeilijker worden uitgescheiden.

Concluderend: we onthulden een specifiek patroon van PA accumulatie binnen *Jacobaea* planten. Deze specificiteit geeft een nieuwe mogelijke verklaring voor een oplossing van het generalist-specialist dilemma. PA's die belangrijke afweerstoffen tegen generalistische insecten zijn komen vooral voor in de middelste laag van het blad waardoor ze minder goed gebruikt kunnen worden voor gastheer herkenning en vraat stimulering door gespecialiseerde insecten. Planten lijken een meervoudige verdedigings strategie te hebben ontwikkeld. Verbindingen zoals CGA worden geaccumuleerd in de buitenste laag van het blad en dienen als eerstelijns verdediging. PA's in het mesofyl vormen de tweede verdedigingslijn. Bovendien vermindert CGA de toxiciteit van PA's en dus zorgt een scheiding van deze verbindingen in verschillende weefsels voor verhoogde PA activiteit tegen insecten. Elk celtype heeft een specifiek chemisch profiel. Daarom moet de studie van SMs zich richten op die weefsels die voor een specifieke herbivoor relevant zijn. In dit proefschrift wordt de rol van jacobine-achtige PA's in de afweer van planten tegen de generalistische herbivoren beter belicht. Jacobine-achtige PA's werden beïnvloed door de aanwezigheid van een mycorrhiza. Jacobine-achtige PA's komen vooral in hogere concentraties voor in de spruiten. Bovendien komen deze PAs in hogere concentraties voor in planten die resistent zijn tegen *F. occidentalis*. We bevestigden de toxiciteit van jacobine-achtige PA's voor een generalistische herbivoor. Deze resultaten wijzen dat een necic acid groep de toxiciteit van PA's verhoogt.

