



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pyrrolizidine alkaloid composition in the plant and its interaction with the soil microbial community

Joosten, L.

Citation

Joosten, L. (2012, September 20). *Pyrrolizidine alkaloid composition in the plant and its interaction with the soil microbial community*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19839>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19839>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19839> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Joosten, Lotte

Title: Pyrrolizidine alkaloid composition of the plant and its interaction with the soil microbial community

Issue Date: 2012-09-20

Directe chemische afweer van planten

Planten worden continu aangevallen door een verscheidenheid aan (micro)organismen. Veel planten produceren diverse chemische stoffen die werken als afweer tegen ziekten en plagen. Waarom produceren planten die diversiteit aan nauw verwante afweerstoffen zoals alkaloiden, fenolen of terpenoiden? Vanuit evolutionair perspectief zijn er verschillende theorieën opgesteld om deze vraag te beantwoorden. Eén van de oudste theorieën is de “arms race hypothesis”, waarvan de voortdurende ontwikkeling van nieuwe afweerstoffen in de plant het resultaat is. Deze hypothese stelt namelijk dat nieuwe afweerstoffen evolueren en een fitness voordeel hebben voor de plant. Door fitnessvoordeel breidt de nieuwe afweerstof zich uit in de populatie, waarmee de stof algemeen wordt. Vervolgens kan er bij de belager een verandering plaatsvinden waardoor deze aangepast raakt aan de nieuwe stof, genaamd adaptatie. De plant is hierdoor hernieuwd kwetsbaar voor zijn belager. Deze hernieuwde kwetsbaarheid biedt een mutant, die een nieuwere stof produceert, een fitnessvoordeel waardoor alles weer van voren af aan begint.

De tweede hypothese veronderstelt dat een breed scala aan verschillende afweerstoffen een sterkere bescherming biedt tegen een belager, dan de productie van één stof in een hele hoge concentratie. De verschillende stoffen samen hebben dan een synergistische effect (Adams and Bernays 1978, Lindroth et al. 1988, Berenbaum et al. 1991). Een derde hypothese stelt dat verschillende afweerstoffen een verschillende uitwerking hebben tegen specifieke belagers. Dit maakt dat, omdat er veel verschillende belagers zijn, ook veel verschillende stoffen evolueren.

Een algemene opvatting is dat het evolueren van de diversiteit aan afweerstoffen onder andere wordt gedreven door herbivore insecten. Populaties van insecten zijn namelijk erg veranderlijk met als gevolg dat de selectieve druk op het chemische afweersysteem van de plant ook aan verandering onderhevig is (Macel et al. 2005). Generalisten, de minder kieskeurige insecten, zijn minder goed aangepast aan hun voedselplanten. Zij zijn naar verwachting meer gevoelig voor verschillen tussen afweerstoffen in de plant dan gespecialiseerde insecten. Specialisten hebben zich toegelegd op een beperkte groep waardplanten en zich daaraan aangepast. Hierdoor zijn ze niet tot minder gevoelig voor de soms kleine chemische verschillen tussen de diverse afweerstoffen in hun specifieke waardplant (Miller and Feeny 1983, Lindroth et al. 1988, Agrawal 2000, Macel et al. 2002, Macel et al. 2005). Specialisten gebruiken afweerstoffen om hun waardplant te lokaliseren. In sommige gevallen gebruiken ze de afweerstoffen voor eigen verdediging. Een voorbeeld is *Tyria jacobaeae*, de sint-jacobsvlinder. Deze vlinder is gespecialiseerd op enkele kruiskruidsoorten en slaat de aanwezige afweerstoffen, pyrrolizidine alkaloiden, uit de plant op met een afstotende werking tegen predatoren (Boppre 1986; Dobler 2001).

Ziekteverwekkers zoals bacteriën en schimmels zijn ook een serieuze bedreiging

voor planten evenals een aantal soorten insecten. Bovendien hebben ze een zeer korte generatietijd waardoor snelle evolutie mogelijk is. Om die redenen zouden micro-organismen mede van invloed kunnen zijn op de selectie van afweermechanismen (Hol and van Veen 2002). De invloed die micro-organismen hebben uitgeoefend op het ontstaan van nieuwe afweerstoffen in de plant is tot op heden veel minder duidelijk dan de invloed van insecten. Historische gezien zijn planten altijd al geconfronteerd met belagers. Lang voordat er herbivore insecten en zoogdieren bestonden op deze planeet moesten planten al een manier vinden om zich staande te houden tegen micro-organismen. Om het ontstaan van het hele pallet aan nauw verwante afweerstoffen in planten te verklaren is het cruciaal dat de belagers zich kunnen aanpassen aan de werking van afweerstoffen. Juist micro-organismen zijn uitstekend in staat zich aan te passen aan hun omgeving. De extreem hoge aantallen individuen en snelle voortplanting van ziekteverwekkende micro-organismen zouden adaptatie tegen de negatieve werking van afweerstoffen in de plant mogelijk maken. Hoe dan ook, bevindingen op basis van ecologische studies over de rol die afweerstoffen spelen in het verdedigen van de plant tegen micro-organismen zijn schaars, zeker in vergelijking met insecten.

Studiesysteem-plant *Jacobaea vulgaris*

Jacobaea vulgaris (synoniem *Senecio jacobaea*) is een uitermate geschikt systeem om de chemische afweer van de plant te bestuderen. Deze soort, in het Nederlands ook wel bekend als jacobskruiskruid (JKK), bevat een goed bestudeerde groep afweerstoffen, genaamd pyrrolizidine alkaloiden (PAs). JKK is een belangrijke voedingsbron voor een verscheidenheid aan insectensoorten (Harper and Wood 1957) en zeer toxisch voor vertebraten. JKK heeft maar weinig te lijden onder ziekteverwekkers in het veld. De meest frequente schimmelinfectie aangetroffen op JKK is de algemene roestsoort *Puccinia dioicae* (Harper and Wood 1957).

Pyrrolizidine alkaloiden

PAs hebben toxicologische en/of afstotende werking op generalistische herbivoren zoals plantetende insecten (van Dam et al. 1995; Hartmann 1999; Hartmann and Ober 2000; Ober 2003; Macel et al. 2005).

In kruiskruidsoorten, zoals JKK of kleinkruiskruid (*Senecio vulgaris*), worden PAs gevormd in de wortels van de plant met als basisstof senecionine *N*-oxide (Hartmann and Toppel 1987; Toppel et al. 1987). Senecionine *N*-oxide wordt getransporteerd via de stengel naar de bladeren en de bloemen, waar het door specifieke enzymen wordt omgezet in verschillende andere PAs (Hartmann and Dierich 1998). Er zijn ongeveer 14 verschillende PAs gedetecteerd in JKK in eerdere studies (Witte et al. 1992; Macel et al. 2004; Kowalchuk et al. 2006). De concentratie en de samenstelling van PAs in JKK is genotype-afhankelijk (Vrieling et al. 1993) en kan beïnvloed worden door de omgeving van de plant (Hol et al. 2003; Macel et al. 2004; Hol et al. 2004; Macel and Klinkhamer 2010).

Twee PA-vormen in de plant

PAs komen in de plant in twee chemische vormen voor: *N*-oxide en in de gereduceerde vorm als vrije base. De wateroplosbare *N*-oxide vorm maakt het mogelijk om PAs te

distribueren tussen weefsels, te transporteren via het floëem transport (Hartmann et al. 1989) en op te slaan in de vacuole van de plantencel (von Borstel and Hartmann 1986; Ehmke et al. 1988). De omzetting van de *N*-oxide vorm naar de vrije base vorm vindt plaats door reductie; een niet specifiek chemisch proces dat geïnduceerd wordt door de aanwezigheid van reducerende stoffen in de plant. Generalistische herbivore insecten reduceren de *N*-oxides in de maag tot vrije base na het eten van JKK. De vrije basen worden vervolgens opgenomen in het lichaam en omgezet in pyrrolen (Lindigkeit et al. 1997; Hartmann 1999). Pyrrolen (heterocyclische aromatische stikstofverbindingen) zijn toxisch omdat ze zich gedragen als zeer reactieve stoffen die zich bijvoorbeeld kunnen binden aan DNA (Mattocks 1986; Frei et al. 1992).

PA *N*-oxides hebben minder afstotende of toxische werking voor generalistische herbivoren dan de bijbehorende vrije basen (Dreyer et al. 1985; van Dam et al. 1995; Macel et al. 2005). Specialistische insecten, aangepast aan PAs, nemen vrije basen op en zetten ze actief om in *N*-oxides (Boppre 1986; Dobler 2001; Nishida 2002; Narberhaus et al. 2003; Lindigkeit et al. 1997).

JKK heeft een ander mechanisme om zich toch te kunnen weren tegen de vraat van specialisten. De plant bevat een hoge voedselreserve in het wortelstelsel voor vegetatieve reproductie en krachtige hergroei om na volledige ontbladering te kunnen overleven (Verkaar 1987; van der Meijden et al. 1989). Te verwachten is dat planten als JKK, die gebruik maken van deze overlevingsstrategie, hun wortels goed verdedigen tegen ondergrondse bodem(micro-)organismen.

Inductie van PAs door bodemmicro-organismen

Planten worden door verschillende organismen zowel boven- als ondergronds tegelijkertijd aangevallen. Wanneer de wortels blootgesteld worden aan ondergrondse belagers (zoals herbivore insecten, nematoden, bacteriën en schimmels) kunnen planten reageren door verschillende soorten directe afweerreacties te geven. Dit kan bovengrondse afweer beïnvloeden doordat afweerstoffen worden getransporteerd en verspreid over de hele plant (van Loon et al. 1998; Paul et al. 2000; van der Putten et al. 2001; Gange et al. 2002; Dicke and Hilker 2003; van Dam et al. 2003; Bezemer et al. 2005; Bezemer and van Dam 2005). Er is tot nu toe weinig bekend over de inductie van PAs door (micro)organismen. Macel and Klinkhamer (2010) ontdekten dat de PA samenstelling in JKK planten veranderde in het veld in vergelijking met de oorspronkelijke samenstelling van dezelfde genotypen opgekweekt onder laboratoriumomstandigheden. Ook bleek, voor deze genotypen, de PA samenstelling afhankelijk van het natuurlijke habitat waarin ze werden uitgeplant. Verder merkte Bezemer et al. (2006) op dat de bovengrondse schade aan JKK door insecten mogelijk te relateren is aan de schimmelgemeenschap in de grond.

Het doel

Het doel van dit proefschrift is om meer informatie te vergaren over het PA afweersysteem in het bijzonder en de interactie met micro-organismen uit de bodem. Het accent ligt met name op de impact die bodemtype en micro-organismen hebben op de ondergrondse en bovengrondse PA samenstelling en de ecologische gevolgen die daaruit voortvloeien. Moleculaire technieken zijn toegepast om een beter inzicht te krijgen in de effecten van

PAs op de microbiële gemeenschappen in de wortels en rhizosfeer van de plant.

Een vernieuwde PA extractie- en analysemethode is ontwikkeld (Patrick Mulder, Rikilt Wageningen) die het mogelijk maakt een beter inzicht te krijgen in de PA concentratie en samenstelling van boven- en ondergrondse plantendelen en de chemische vorm waarin PA voorkomen.

Een verbeterde analysemethode voor PAs

Voor het begrijpen van de rol die specifieke plantenstoffen spelen bij de afweer van planten is het allereerst van belang dat we ze op de juiste wijze kunnen meten. In veel gevallen is de extractie- of analysemethode van grote invloed op wat we (kunnen) meten.

De traditionele methode bestaat uit een PA extractie met zwavelzuur, een PA reductie met zink en een zuiveringsstap voor gaschromatografie gekoppeld aan een stikstof-fosfor detector (GC-NPD). Tijdens de toepassing van de traditionele methode maakt men gebruik van een aantal onvriendelijke stoffen zoals zwavelzuur en zink. Een ander nadeel van de traditionele methode is dat een reductiestap essentieel is omdat de GC geen PA *N*-oxiden kan detecteren. Mede door deze twee negatieve eigenschappen van de traditionele methode is een vernieuwde methode ontwikkeld. De nieuwe methode bestaat uit PA extractie met mierenzuur met maar één eenvoudige verdunningsstap gevolgd door de analyse met vloeistofchromatografie gekoppeld aan een dubbele massaspectrometer (LC-MS/MS). Deze twee verschillende methoden zijn vergeleken door de PAs in een aantal gevriesdroogde JKK monsters te meten (zie hoofdstuk 3). De PA concentraties waren hoger in de metingen met de LC-MS/MS dan met de GC-NPD. De introductie van de dubbele massaspectrometer als detector in combinatie met de scheiding van PAs met behulp van de vloeistofchromatograaf vergroot de mogelijkheden om individuele PAs te identificeren en te meten (Betteridge and Colegate 2005; Wuilloud et al. 2004). De LC-MS/MS detecteerde tijdens de test tot dertien verschillende vrije basen in de JKK extracten terwijl GC-NPD maar zeven vrije basen detecteerde. Met de GC-NPD waren maar vier grote PAs (senecionine, seneciphylline, integerrimine and jacobine) consequent gedetecteerd in alle JKK monsters. De concentratie van de andere drie PAs was in een aantal gevallen simpelweg net beneden de meetgrens van de GC-NPD.

De nieuwe methode, mierenzuurextractie in combinatie met LC-MS/MS, is de gekozen methode om de PAs te analyseren tijdens het onderzoek beschreven in dit proefschrift.

Vrije basen aanwezig in de plant

Het simultaan kunnen detecteren van PA *N*-oxides en vrije basen in JKK extracten met de nieuwe methode biedt voor het eerst de mogelijkheid om het relatieve belang van deze twee vormen voor de afweer van de plant te bestuderen. In dit hoofdstuk tonen wij aan dat vrije basen aanwezig zijn in het plantenextract en dat dit geen artefact is van de nieuwe methode. Wij concluderen daarom dat voor specifieke PAs, hoge concentraties aan vrije basen aanwezig zijn in de plant in tegenstelling tot wat nu toe in de literatuur werd aangenomen. Wij ontdekten dat Jacobine-chemotypes bovengronds een veel hogere concentratie aan vrije basen hebben in vergelijking met de Erucifoline-chemotypes, omdat het vooral de jacobine-achtige PAs zijn die in gereduceerde vorm aanwezig zijn in de plant.

Daarnaast hebben we, door het analyseren van alle PA *N*-oxides en vrije basen in de wortels en bladeren van *F₂* hybriden (*J. vulgaris* en *J. aquatica*), aangetoond dat het aandeel vrije basen sterk afhankelijk is van de PA soort en het genotype.

Twee mogelijke hypothesen, die elkaar niet noodzakelijkerwijs uitsluiten, kunnen de bovengenoemde waarnemingen verklaren. Allereerst zou de chemische transformatie van de ene naar de andere PA *N*-oxide, en verspreiding van *N*-oxides over de weefsels van de plant, vergezeld kunnen gaan van een continue langzame reductie van PA *N*-oxides. Dit passieve proces zou de aanwezigheid van lage hoeveelheden vrije basen verklaren (Hartmann 2010, persoonlijke communicatie). Daarnaast zou specifieke (re-)oxidatie van vrije basen ook onze resultaten kunnen verklaren. De reductie van PA *N*-oxides in de plant is een niet-specifiek chemisch proces dat geïnduceerd wordt door de aanwezigheid van endogene reducerende stoffen en (sporen van) overgangsmetalen zoals magnesium en ijzer. Dit deel komt nog overeen met de eerste hypothese van Hartmann (2010, persoonlijke communicatie), maar tegelijkertijd is er een biochemisch proces aan de gang, dat de gereduceerde vrije basen re-oxideert, speciaal voor transport van PAs en de verspreiding over de weefsels. Mogelijk zijn hier enzymen bij betrokken die goed werken voor senecionine-achtige en erucifoline-achtige PAs maar minder goed werken voor jacobine-achtige PAs. Deze tweede hypothese verklaart niet alleen de aanwezigheid van vrije basen in de plant maar ook het verschil in het aandeel vrije basen dat sterk afhankelijk is van de PA soort en het genotype. De tweede hypothese wordt ook ondersteund door het feit dat het enzym dat nodig is voor de re-oxidering zeer waarschijnlijk een sterke verwantschap heeft met het enzym dat nodig is om de primaire PA, senecionine *N*-oxide, aan het begin van de PA-pathway te vormen. Aangezien de plant een soortgelijk re-oxidatie-enzym produceert, is de stap om een enzym te ontwikkelen om vrije basen om te zetten naar *N*-oxides voor transport en verspreiding over de plant, niet ondenkbaar.

Het ontdekken van de hoge concentraties vrije basen in sommige specifieke JKK genotypen is vanuit een evolutionair en ecologisch oogpunt zeer interessant aangezien meerdere studies hebben laten zien dat vrije basen meer toxisch zijn dan hun respectievelijke *N*-oxides (Dreyer et al. 1985; van Dam et al. 1995; Macel et al. 2005). Het feit dat voornamelijk de jacobine-achtige PAs in hoge concentraties aan vrije basen in de plant aanwezig zijn is, vanuit een ecologisch standpunt, in overeenstemming met de resultaten van ander onderzoek dat laat zien dat jacobine-achtige PAs de belangrijkste PA afweerstoffen zijn van JKK tegen generalisten zoals tripsen (Macel et al. 2005; Leiss et al. 2009; Macel 2010), terwijl sommige specialisten, zoals *Tyria jacobaeae*, juist de voorkeur geven aan JKK planten met hoge concentraties jacobine (Macel and Klinkhamer 2009). Er is echter meer onderzoek nodig naar de chemie en de biologie van PA *N*-oxides en vrije basen en de invloed op generalisten en specialisten, om de ecologische betekenis van deze hoogst interessante afweerstoffen volledig te kunnen begrijpen.

De impact van bodemmicro-organismen op plantengroei en PA samenstelling

De mogelijke impact die micro-organismen uit de bodem hebben op het bovengrondse chemische afweersysteem van de plant is bestudeerd door gebruik te maken van reproduceerbare genotypen. Twee verschillende JKK genotypes, oorspronkelijk van een duingebied (Meijendel), zijn vermeerderd met behulp van weefselkweek. De planten

hebben daarna zes weken tijd gehad te groeien in twee gesteriliseerde bodemtypen (zandgrond uit de duinen in Meijndel en humusrijke grond afkomstig uit een proeftuin in Heteren) al dan niet geïnoculeerd met 5% ongestriliseerde grond van één van de twee bodemtypen. In totaal waren er dus zes behandelingen. De planten die groeiden in gesteriliseerde grond hadden het hoogste drooggewicht, terwijl planten die groeiden in gesteriliseerde grond geïnoculeerd met niet-gesteriliseerde grond van het eigen bodemtype, het laagste drooggewicht hadden. Dit betekent dat na het toevoegen van een kleine hoeveelheid grond-inoculum (5%) in de 'biologisch lege' gesteriliseerde grond van hetzelfde bodemtype, de micro-organismen zich tot een gemeenschap ontwikkelen die in staat is de plantengroei te remmen. Dit resultaat ondersteunt eerdere literatuur waarin aangetoond wordt dat plantengroei aanzienlijk kan afnemen wanneer planten in een grond groeien die micro-organismen bevat die uit hun eigen natuurlijke omgeving komen (van der Putten et al. 1993; Bever et al. 1997; Klironomos 2002).

Inoculatie met 'de andere' niet-gesteriliseerde grond, resulteerde in een hoger drooggewicht van de plant in vergelijking met inoculatie met 'eigen' niet-gesteriliseerde grond. Inoculatie met 'de andere' niet-gesteriliseerde grond heeft waarschijnlijk ook potentiële pathogenen geïntroduceerd maar mogelijkwerwijs waren deze pathogenen minder aangepast aan het 'nieuwe' bodemtype.

De onder- en bovengrondse PA samenstelling in de plant bleek significant beïnvloed te worden door het bodemtype en de inoculumbehandeling (zie hoofdstuk 5). Het effect op de totale PA concentratie was relatief klein. Ook toen het bovenstaande experiment gedeeltelijk herhaald werd (met meer genotypes met verschillende PA samenstellingen) bleek wederom dat de bovengrondse PA samenstelling significant beïnvloed werd door bodemmicro-organismen (zie hoofdstuk 6). De veranderingen in het PA afweersysteem van planten tijdens het tweede experiment kwamen sterk overeen met de planten uit het eerste experiment. Ook de genotypen onderling vertoonden een soortgelijke reactie tijdens het tweede experiment, waar naast Jacobine-chemotypes ook Erucifoline-chemotypes gebruikt zijn. Dit waren alle genotypes uit weefselweek die oorspronkelijk afkomstig waren van verschillende populaties uit verschillende gebieden.

Bodemtype en bodemmicro-organismen beïnvloedden de PA samenstelling in de wortels en spruit van JKK voornamelijk door de concentratie van specifieke PAs te veranderen. Bijvoorbeeld de concentratie retrorsine en retrorsine *N*-oxide was verhoogd in planten die groeiden op grond geïnoculeerd met niet-gesteriliseerde Heteren grond. Retrorsine *N*-oxide wordt gevormd door aan senecionine *N*-oxide een hydroxy-groep toe te voegen. Dit proces wordt blijkbaar gestimuleerd door het Heteren inoculum. Naast de veranderingen in retrorsine en retrorsine *N*-oxide, waren de concentraties jacobine en jacobine *N*-oxide verhoogd in de spruit van planten die groeiden op Heteren grond, voornamelijk in gesteriliseerde Heteren grond geïnoculeerd met niet-gesteriliseerd Meijndel grond. De verandering in concentraties bovengronds voor jacobine is extra interessant omdat juist deze specifieke PA verantwoordelijk is voor de hoge concentraties vrije basen in de plant, die uit eerder verschenen onderzoek afstotelijker en/of giftiger bleken te zijn dan de corresponderende *N*-oxides. Eerder onderzoek naar micro-organismen toonde aan dat JKK planten, met hoge concentraties jacobine in de wortels, een lagere diversiteit aan rhizosphere schimmels had in vergelijking met JKK planten met zeer lage concentraties jacobine

in de wortels (Kowalchuk et al. 2006).

Het effect van de bodemmicrobiële samenstelling op bovengrondse resistentie

Meerdere onderzoekers geven aan dat ondergrondse interacties tussen bodemorganismen en de plant van invloed kunnen zijn op het afweersysteem in bovengrondse delen van de plant en daarmee ook effect hebben op de herbivore insecten (van Loon et al. 1998; van der Putten et al. 2001; Paul et al. 2000; Gange et al. 2002; Dicke and Hilker 2003; van Dam et al. 2003; Bezemer et al. 2005; Bezemer and van Dam 2005). Om die reden hebben wij het effect door bodemmicroorganismen op de resistentie van de plant tegen trips (*Frankliniella occidentalis*) onderzocht door de zilverschade op de bladeren te meten. Zilverschade is de schade aan de plant die ontstaat doordat tripsen plantencellen leegzuigen. Zilverschade aan de plant verschilde sterk tussen de verschillende JKK genotypes. Genotypes met zeer lage concentraties jacobine-achtige PAs hadden de grootste zilverschade terwijl genotypes met hoge concentraties aan jacobine-achtige PAs de laagste zilverschade vertoonden.

Hoewel de hoeveelheid zilverschade grotendeels afhankelijk was van het JKK genotype, bleek de resistentie tegen trips ook beïnvloed te worden door het inoculum. Echter dit was slechts voor één van de vijf gebruikte genotypen significant. We hebben het experiment daarom herhaald met twee genotypen; het genotype waarvoor het grond-inoculum een effect had op bovengrondse zilverschade en een genotype waarbij dat niet het geval was. Om de statistische power te verhogen vond dit tweede experiment plaats met het dubbele aantal replica's. De resultaten van het eerdere experiment werden hierdoor bevestigd. Het inoculum heeft een significant effect op de tripsresistentie maar dit effect is genotype afhankelijk.

PA afweersysteem beïnvloedt de schimmelgemeenschap maar heeft vrijwel geen effect op de bacterie- en mycorrhizagemeenschap in de wortels en rhizosfeer grond

Veel plantensoorten hebben een hoge voedselreserve in de wortels. Dit is ten behoeve van vegetatieve reproductie en krachtige hergroei om te kunnen overleven na volledige ontbladering door specialistische herbivoren (Verkaar 1987; van der Meijden et al. 1989). Te verwachten is dat de soorten die gebruik maken van deze overlevingsstrategie hun wortels goed verdedigen tegen ondergrondse herbivoren en pathogenen. Planten gebruiken afweerstoffen als beschermingsmechanisme. Deze afweerstoffen hebben een giftige en/of afstotende werking op generalistische belagers (Falk and Doran 1996; Hol et al. 2003; Thoden et al. 2009).

Veel micro-organismen leven in de rhizosfeer; dit is de grond die onder directe invloed van de wortels van de plant is (Hiltner 1904). De microbiële gemeenschappen worden in de basis gevormd door een selectie uit micro-organismen die aanwezig zijn in de omliggende grond buiten de rhizosfeer (Kowalchuk et al. 2002; de Ridder-Duine et al. 2005). Plantenwortels scheiden stoffen uit die de kolonisatie van micro-organismen, zoals pathogenen en symbionten, onderdrukken en stimuleren (Marschner et al. 2001 and 2002; Bais et al. 2006; Badri and Vivanco 2009). Over de afwerende werking van stoffen, zoals PAs, om de plant te beschermen tegen pathogene micro-organismen is nog maar weinig bekend.

In hoofdstuk 7 rapporteer ik over de invloed van plant genotype, verschillen in PA compositie en PA type op micro-organismen. In het bijzonder op de

gemeenschapsstructuur van schimmels en bacteriën in de plantwortels en rhizosfeer. Ook het effect op arbuscular mycorrhiza schimmels (AMF) in de wortels wordt beschreven. In het experiment zijn vier verschillende JKK genotypes gebruikt met verschillende PA samenstellingen. Deze planten zijn uitgekozen op de aan- en afwezigheid van jacobine-achtige PAs (Kowalchuk et al. 2006) en na weefselkweek, opgepot in twee soorten bodemtypes: löss and zand.

De schimmelgemeenschap was duidelijk genotype afhankelijk, zowel in plantenwortels als in rhizosfeer. Er zijn weinig indicaties dat het genotype-effect gerelateerd was aan de PA samenstelling. Enkel de schimmeldiversiteit in de wortels was lager in Erucifoline-chemotypes in vergelijking met Jacobine-chemotypes op zandgrond. Daarnaast is ook een negatieve correlatie gevonden tussen de totale erucifoline-achtige PAs en de schimmeldiversiteit in de wortels. Dit ligt niet in lijn met de resultaten van Kowalchuk et al. (2006). Deze studie impliceert dat de PA samenstelling in de plant invloed heeft op de schimmelgemeenschap in de rhizosfeer. Planten met een lage concentratie aan jacobine-achtige stoffen in de wortels van de plant hadden een hogere schimmeldiversiteit in de rhizosfeer dan planten met een hoge concentratie aan jacobine-achtige PAs in de wortels. Er zijn geen significante verschillen gevonden tussen de genotypes in de bacteriegemeenschappen in wortels en rhizosfeer.

Het bodemtype beïnvloedde de AMF-gemeenschap in de wortels van de plant maar het plantengetype niet. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de grond sterker selecteert voor AMF-kolonisatie in de plant dan de individuele plant zelf. Het effect van bodemtype op de AMF-gemeenschap in de wortels kan veroorzaakt zijn door de originele grondverschillen. Dit kan geconcludeerd worden uit het feit dat aan het begin van het experiment twee verschillende bodemtypes een verschillende samenstelling aan AMF schimmeldraden en sporen bevatten. Dit verschil was kennelijk groter dan de selectiedruk van de plant op de AMF kolonisatie. Ook voor de drie structurele PA groepen (senecionine-, erucifoline- en jacobine-achtige PAs) vonden wij geen relatie met de AMF soortenrijkdom in de wortels van de plant.

We hoopten de resultaten van Kowalchuk et al. (2006) te bevestigen met een meer uniforme genetische achtergrond. Dit door gekloonde weefselkweek planten te gebruiken in plaats van individuele planten te selecteren uit veldpopulaties. Het huidige resultaat dat PAs weinig invloed hebben op het vormen van de microbiële gemeenschapsstructuur in de rhizosfeer en wortels van de plant, is mogelijkwerwijs een effect van te lage jacobine concentratie in de gebruikte planten tijdens dit experiment. De totale PA concentratie van de jacobine-achtige PAs in de wortels van de planten gebruikt tijdens het experiment, lagen vier keer lager dan de totale PA concentratie van de jacobine-achtige PAs in de wortels van de planten gebruikt door Kowalchuk et al. 2006.

Hoofdstuk 2 behandelt de huidige kennis van PAs in relatie tot antimicrobiële activiteiten, adaptatie en detoxificatie door micro-organismen (zie hoofdstuk 2). Veel in-vitro experimenten hebben effecten van PAs op micro-organismen aangetoond (Hol and van Veen 2002; Hol 2003). Deze resultaten laten zien dat micro-organismen in potentie belangrijk kunnen zijn geweest in het ontstaan van de diversiteit aan PAs in planten als JKK. Wanneer de verschillende individuele PAs invloed hebben op de verschillende microbiële soorten en er adaptatie plaatsvindt, zullen planten die nieuwe effectieve afweerstoffen

synthetiseren, onder selectieve druk van belagers, meer succesvol zijn dan anderen. Er zijn nog maar enkele in-vivo studies gepubliceerd die de resultaten van in-vitro studies ondersteunen (Kowalchuk et al. 2006).

Samenvattend worden in dit proefschrift de resultaten over de PA samenstelling in JKK en het effect op bodemmicro-organismen en vice versa gepresenteerd. Opvallend is de aanwezigheid van vrije basen in de plant. Verder is duidelijk dat meer onderzoek wenselijk is, met name ecologische experimenten en veldonderzoek naar de interactie tussen micro-organismen en PAs in de plant. Voor volgend onderzoek aan PAs is het aan te bevelen F2 kruiskruid-kruisingen (Kirk et al. 2010) te gebruiken in plaats van JKK planten. Deze kruiskruid-kruisingen bieden een potentieel hogere variatie in PA concentratie en PA samenstelling. Daarnaast zijn deze kruisingen genetisch sterk verwant, doordat ze dezelfde (groot-)ouders delen (Cheng et al. 2011). Hierdoor kunnen genotypes geselecteerd worden met extreme verschillen in PA compositie; dit zonder grote effecten van onbekende fysiologische eigenschappen van de plant (Kirk et al. 2010).