



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Evolution and development of orchid flowers and fruits

Dirks, A.

Citation

Dirks, A. (2020, February 5). *Evolution and development of orchid flowers and fruits*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/84583>

Version: 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/1887/84583>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/84583> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dirks-Mulder, A.

Title: Evolution and development of orchid flowers and fruits

Issue Date: 2020-02-05

APPENDIX

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Glossary and abbreviations

Nederlandse samenvatting

Inleiding

De orchideeënfamilie is de op één na grootste familie van bloeiende planten, met ongeveer 880 geslachten en meer dan 28.000 soorten. De familie komt bijna overal op de wereld voor, maar de meeste soorten zijn te vinden in de tropen. Orchideeën behoren tot de groep van de eenzaadlobbige, ook wel monocotylen of kortweg monocots genoemd. De andere groep bloeiende planten zijn de tweezaadlobbigen (eudicotylen). Een bekend onderzoeksmodel uit deze groep is de zandraket (*Arabidopsis thaliana*). Een orchideeënbloem is opgebouwd uit verschillende bloemkransen. Van buiten naar binnen zijn dit drie kroonbladen, gevolgd door drie kelkbladen. Samen omsluiten zij de vrouwelijke en mannelijke voortplantingsorganen. Eén kroonblad van een orchideeënbloem, de lip, is meestal anders van grootte, maar ook van kleur en vorm dan de andere twee kroonbladen. Verder bevatten de helmhokjes van veel orchideeën geen los stuifmeel, maar stuifmeelklompjes en vaak is er maar één fertiele meeldraad in plaats van drie of zes. Buiten deze gedeelde kenmerken is de diversiteit van orchideeënbloemen enorm, denk o.a. aan kleur, grootte en de vorm van de bloemblaadjes. Orchideeënbloemen zijn vooral zo divers vanwege de interactie met bestuivers.

Bloemonderzoek aan *Erycina pusilla*

Om de enorme diversiteit aan orchideeënbloemen en -vruchten beter te begrijpen, heb ik onderzoek gedaan naar genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van een selectie aan bloemorganen. Door expressie van MADS-box genen te bestuderen binnen verschillende organen en door te kijken naar de uiterlijke en innerlijke kenmerken, kon de evolutionaire oorsprong opgehelderd worden. Als modelorganisme heb ik de orchideeënsoort *E. pusilla* gebruikt. *Erycina pusilla* komt in het wild in Centraal en Midden-Amerika voor. De lijn waar ik mee werkte komt uit Suriname en is al meer dan 20 jaar in kweek in Nederland. De reden voor het gebruik van *E. pusilla* is dat het een kleine en snelgroeiende orchidee is, welke steriel gekweekt kan worden in een laboratorium. De soort heeft ook een klein en diploïd genoom. Dit laatste is handig bij het volledige in kaart brengen van het genoom. Op het moment dat ik met mijn onderzoek startte was al wel een transcriptoom beschikbaar van *E. pusilla*, maar nog geen genoom.

Binnen de orchideeën zijn veel soorten bedriegers, waarmee wordt bedoeld dat zij bestuivers aantrekken, maar geen beloning aanbieden in de vorm van bijvoorbeeld nectar of olie. Door geen beloning te produceren bespaart de plant veel energie. Hoe dit zo is geëvolueerd, is niet duidelijk. *Erycina pusilla* is ook zo'n bedrieger; de bloemen hebben een vergroot middelste kelkblad, een callus bovenop de lip en twee vleugelachtige aanhangsels, ook wel steldia genoemd, om bijen aan te trekken. Deze bijen zijn op zoek naar olie, maar vinden dit bij *E. pusilla* niet. Toch nemen ze bij hun bezoek tijdens de zoektocht naar een beloning stuifmeelklompjes mee naar een andere *E. pusilla* bloem. De bloemen zijn zo gevormd dat zij gelijkenis

vertonen met de bloemen van bomen uit de Malpighiaceae familie, die hun bestuivers wel belonen. Orchideeën en Malpighiaceae zijn niet verwant: de eerste familie behoort tot de monocotylen, de tweede tot de dicotylen.

In **hoofdstuk 2** wordt onderzoek beschreven naar de evolutionaire oorsprong van de lip van de bloemen van *E. pusilla* en andere orchideeënsoorten. Bij de vorming van de lip van *E. pusilla* blijkt het lip-complex actief. Dit is consistent met het “Perianth Code model” voor lipiditeit van orchideeën. Het lip-complex bestaat in *E. pusilla* uit de volgende drie MADS-box genen: *AGL6 EpMADS5*, *APETALA3 EpMADS13* en *PISTILLATA EpMADS16*.

In **hoofdstuk 3** onderzochten wij de evolutionaire oorsprong van het middelste petaloïde bloemblad van de buitenste krans, het callus en de stelidia van *E. pusilla*. We gebruikten daarvoor een combinatie van morfologische, moleculaire en fylogenetische technieken. Door de vaatbundels in een volwassen bloem te volgen, maar ook de buitenste cellaag te bestuderen en genexpressie patronen te vergelijken van alle bloemorganen, kwamen we tot een aantal belangrijke nieuwe inzichten. De vaatbundel naar het mediane bloemblad van de buitenste krans gaf aan dat het een kelkblad was met kenmerken die typisch zijn voor kroonbladen, zoals bijvoorbeeld de bolvormige epidermale cellen. De expressie van twee MADS-box genen (*AGL6 EpMADS4* en *APETALA3 EpMADS14*) was hoog in de groene zijdelingse kelkbladen van *E. pusilla*, maar laag in het mediane kelkblad en de kroonbladen. Mogelijk correleert deze lage genexpressie met het uiterlijk van een kroonblad. Het lip-complex bleek bij *E. pusilla* niet alleen in de lip maar ook in het callus actief. De vaatbundel naar de lip gaf aan dat de lip tot de kroonbladen behoort. Zes vaatbundels gaan in *E. pusilla* naar de callus, de stelidia en naar de fertiele meeldraad. Alle drie de AGAMOUS MADS-box genen komen niet tot expressie in de callus, wat consistent is met de steriliteit van dit bloemonderdeel.

MADS-box genen spelen mogelijk ook een belangrijke rol in organen in de binnenste bloemkransen die bij de voorouders van *E. pusilla* nog fertiel waren, maar in de loop van de evolutie steriel zijn geworden en uiteindelijk tot gespecialiseerde bloemorganen zijn geëvolueerd als callus en stelidia. *AGAMOUS EpMADS22* en *SEPALLATA EpMADS6* komen het sterkst tot expressie in de meeldraden en *AGAMOUS EpMADS20* en *SEEDSTICK EpMADS23* komen sterk tot expressie in de stelidia. Dit laatste suggereert dat *EpMADS22* mogelijk nodig is voor de vorming van vruchtbare meeldraden. Het mediane bloemblad van de buitenste krans van *E. pusilla* lijkt te zijn afgeleid van een kelkblad. Het callus was oorspronkelijk een meeldraad, die een bloemblad-identiteit kreeg. En de stelidia zijn afgeleid van steriel geworden meeldraden. Op deze manier bootst *E. pusilla* een niet-verwante en belonende bloem na. Duplicaties, maar ook selectie en veranderingen in expressie van verschillende MADS-box-genen speelden een belangrijke rol in de evolutie en ontwikkeling van deze bloemorganen. Dat niet alle vragen met betrekking tot bedrog van bestuivers met dit onderzoek zijn opgelost, moge duidelijk zijn. Voor *E. pusilla* zijn we echter weer een stapje verder gekomen in het begrijpen hoe deze bloemen zo zijn gevormd dat een optimale bestuiving mogelijk is, zonder een

beloning te produceren en dus energie te besparen.

Vruchtonderzoek aan *E. pusilla*, *Cynorkis fastigiata* en *Epipactis helleborine*

Na bestuiving van een orchideeënbloem en bevruchting van de zaadknoppen verandert het onderstandig vruchtbeginsel na enige weken tot maanden in een vrucht met zaden. De vruchten beschermen de kiemende zaden tegen vraatzuchtige insecten, schimmels en Uv-straling, en zorgen er uiteindelijk ook voor dat de zaden op een efficiënte manier worden verspreid. Wanneer de vrucht rijp is, splitst deze open en worden de zaden vervolgens verspreid, meestal via de wind. Er zijn ook orchideeënavruchten die niet opensplitsen, deze worden opgegeten door dieren. De zaden worden dan op een andere locatie verspreid via de ontlasting van de verspreider. De morfologische verscheidenheid van vruchten en mechanismen van openspringen is groot binnen de orchideeënfamilie. Hoe verschillende vruchten zich ontwikkelen en welke moleculaire netwerken hierachter schuilgaan, is nog grotendeels onbekend. Het meeste onderzoek is gedaan aan de zandraket: deze plantensoort wordt al vele jaren als genetisch model gebruikt in onderzoek aan vruchten.

In **hoofdstuk 4** onderzochten wij, opnieuw met behulp van een combinatie van morfologische, moleculaire en fylogenetische technieken, de evolutie en ontwikkeling van de morfologie van orchideeënavruchten. Ook het mechanisme van opensplitsen van vruchten is door ons onderzocht om meer inzicht te krijgen in het moleculaire netwerk dat ten grondslag ligt aan de ontwikkeling van orchideeënavruchten. Wij hebben voor dit onderzoek de vruchtontwikkeling van *E. pusilla*, een epifytische orchidee met luchtwortels, vergeleken met twee soorten die wortelen in de grond, *C. fastigiata* en *E. helleborine*. Ons onderzoek leverde aanvullend bewijs voor het "Split-carpel model". Volgens dit model bevatten de vruchten van de meeste orchideeënsorten drie fertiele en drie steriele valven. Het opensplitsen vindt plaats aan beide zijden van de placenta's. Tevens werden interessante verschillen waargenomen in de cellen waarmee de vruchten uiteindelijk opensplitsen. Terwijl *C. fastigiata* en *E. helleborine* daar een gelignificeerde laag ontwikkelden, deed *E. pusilla* dit niet. In de vruchten van deze laatste soort werd een lipide-achtige cellaag ontdekt, waarlangs de rijpe vrucht openscheurt.

Homologe genen van *E. pusilla* met mogelijk dezelfde functie in vruchtontwikkeling als de zandraket zijn door ons onderzocht. Het betrof vruchtgeassocieerde transcriptiefactoren, waaronder *HEC3*, *RPL* en *SPT*, en verschillende MADS-box genen. Ontdekt werd dat deze genen binnen het genetische netwerk van vruchtontwikkeling en opensplitsen goed geconserveerd lijken te zijn. Eiwit-eiwit interactiestudies lieten zien dat complexen van MADS-box eiwitten, bestaande uit FUL-, SEP- en AG-homologen, ook kunnen worden gevormd in de vruchten van *E. pusilla*. De expressie van *HEC3*, *RPL* en *SPT* in vruchten van *E. pusilla* was grotendeels hetzelfde als de expressie in de vruchten van de zandraket. Onze genexpressie-studie bracht echter ook verschillen aan het licht. Deze verschillen verklaren mogelijk het verschil in morfologie tussen de hauwtjes van de zandraket

en droge doosvruchten van de door ons onderzochte orchideeënsoorten.

Vergelijkend transcriptoom- en kenmerkonderzoek van orchideeënvruchten

De orchideeënfamilie staat vooral bekend om haar enorme bloemdiversiteit. Orchideeënvruchten zijn echter ook zeer divers maar veel minder goed bestudeerd. Een van de eerste doelen in het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** was om genen en mogelijke netwerken van genen te detecteren die betrokken zijn bij de vruchtontwikkeling van *E. pusilla*. Dit onderzoek was gericht op een veel bredere set genen dan de transcriptiefactoren besproken in het vorige hoofdstuk. Voor het onderzoek in **hoofdstuk 5** is RNA geïsoleerd van *E. pusilla* vruchten uit verschillende ontwikkelingsstadia. Vervolgens is de genetische code van RNA-strengen afgelezen met een IlluminaHiSeq sequencer. Omdat er geen referentiegenoom van *E. pusilla* beschikbaar was, is met alle verkregen data een volledig vruchten-transcriptoom gegenereerd. Hiervoor werd een bioinformatische pijplijn ontwikkeld om automatisch orchideeënt transcriptomen *de novo* te assembleren, annoteren en kwantificeren. Al snel bleek dat het *de novo* assembleren te veel ongewenste iso-vormen van genen opleverde. Tevens bleek NCBI Genbank te weinig referentiesequenties van orchideeënvruchten te bevatten voor een juiste annotatie.

We hebben vervolgens een referentiegenoom van een andere orchidee gebruikt en de *E. pusilla* transcriptoomdata daarmee vergeleken. Hiervoor is het referentiegenoom van *Phalaenopsis equestris* gekozen alsmede de annotatie van *P. equestris*. Deze aanpak leverde betere resultaten op dan de eerder uitgevoerde *de novo* assemblage. Voorlopige resultaten tonen aan dat genen die betrokken zijn bij verschillende processen tijdens de ontwikkeling van vruchten en zaden van *E. pusilla*, zoals pollenbuisvorming, zaadontwikkeling en lignificatie, differentieel tot expressie komen in de tijd. Momenteel worden er aanvullende transcriptomen van vruchten van orchideeënsoorten gegenereerd met een andere wijze van opensplitsen. Vergelijkende transcriptoom-analyses zullen vervolgens helpen onthullen welke ontwikkelingsgenen de morfologische diversiteit van orchideevruchten aansturen. In **hoofdstuk 5** werd ook onderzocht of er een correlatie gevonden kon worden in de evolutie van 12 binair gescoorde eigenschappen van orchideeënvruchten. Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van een gecombineerde *nrITS*, *matK* en *rbcL* fylogenie. Van 41 verschillende orchideeënsoorten uit vijf subfamilies werden rijpe vruchtjes verzameld, geanalyseerd, met de hand gesneden en gekleurd met floroglucinol om lignificatie van de vrucht tijdens het rijpingsproces zichtbaar te maken. Met behulp van Reversible-jump Markov chain Monte Carlo (RJ MCMC) simulaties werd vervolgens onderzocht of er sprake was van een mogelijke gezamenlijke evolutie van vruchtkenmerken.

Er bleek binnen orchideeënvruchten veel variatie te zijn in het type (bes, droge of vlezig doosvrucht), de oriëntatie (rechttopstaand of hangend), rijpingstijd (meer of minder dan drie maanden), het aantal openingen tussen de valven (slechts één, twee, drie of meer) en de lignificatiepatronen. Deze laatste varieerden van

Appendix

helemaal geen lignificatie tot verhouting van het exocarp, endocarp, en/of de cellaag waarlangs orchideeënvruchten opensplitsen.

Met behulp van statistische analyses is er bewijs van co-evolutie gevonden tussen de leefwijze van orchideeën en de rijpingstijd van de vruchten. Vruchten van epifytische orchideeën en lianen blijken een significant langere rijpingstijd te hebben, 4 maanden of meer, dan vruchten van aardorchideeën. Er bleek ook co-evolutie te hebben plaatsgevonden tussen de leefwijze en het aantal openingen van de vruchten. Vruchten van epifytische orchideeën en lianen splitsen op minder plaatsen open dan de vruchten van aardorchideeën. Verder bleek de oriëntatie van de vruchten te correleren met de omgevingstemperatuur en leefwijze. Orchideeënsoorten met hangende vruchten komen vaker voor bij gemiddelde tot hoge temperaturen dan bij lage temperaturen en meer bij epifyten en lianen dan bij aardorchideeën. Ten slotte blijkt lignificatie van de valven te zijn geëvolueerd in zowel hangende als rechtopstaande orchideeënvruchten. Het is nog niet zeker of deze correlaties blijven bestaan als meer soorten aan dit onderzoek worden toegevoegd. Voorlopig wordt daarom ingezet op een uitbreiding van de dataset. Deze uitbreiding is vooral gericht op geslachten die zowel epifytische als bodembewonende soorten bevatten, zoals bijvoorbeeld *Cymbidium* en *Malaxis*, en op orchideeën waarvan de vruchten niet opensplitsen, zoals bij het ondergronds bloeiende Australische geslacht *Rhizanthella*. Uiteindelijk hopen we daarmee net zoveel te weten te komen over de evolutie en ontwikkeling van orchideeënvruchten als -bloemen.