

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/139044> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wahyuni, D.S.C.

Title: Thrips resistance in gladiolus: An eco-metabolomic approach

Issue Date: 2021-01-12

Algemene discussie en conclusie

Resistentieveredeling wordt steeds belangrijker voor het verminderen van het gebruik van pesticiden. Daarvoor kunnen we tegenwoordig een moleculaire toolbox gebruiken. Voor sommige gewassen is deze toolbox nog niet toereikend vanwege hoge ploïdie-graad of vanwege de grootte van het genoom. Een snel en goedkoop alternatief kan zijn om gebruik te maken van morfologische of chemische markers. Om dit te doen moeten resistentiemechanismen in de planten worden onderzocht en hoe deze kunnen veranderen onder invloed van omgevingsfactoren of plantontwikkeling. Op basis van deze ideeën hebben we markers ontwikkeld voor tripsresistentie in gladiolen.

Gladiolen zijn sierbloemen met een breed scala aan variaties in tripsweerbaarheid. Tripsschade werd bij veertien variëteiten, waaronder dwerg-, middelgrote en grote gladiolen, vergeleken (Hoofdstuk 2). We vonden een 130-voudig verschil in zilverschade tussen de meest resistente en de meest vatbare variëteiten. De morfologie van het blad droeg sterk bij aan de tripsresistentie. De dichtheid van papillen was negatief gecorreleerd met tripsschade, terwijl de lengtes van de mesofyl- en epidermiscellen positief gecorreleerd waren met tripsschade. In de regel produceerde een epidermiscel een enkele papil. Dus rassen met kleinere bladcellen hadden een hogere dichtheid aan epicuticulaire papillen en waren daarom het meest resistent. De dichtheid van papillen verklaarde 39% van de variatie in zilverschade. Papillen kunnen de beweging van trips remmen en het binnendringen van de epidermis door trips belemmeren. Scott, Brown en Simmonds (2006) die de effecten van bladmorphologie op *Heliothrips haemorrhoidalis* bestudeerden, meldden dat deze trips een voorkeur had voor bladeren met gladde oppervlakken, terwijl trichomen en wasstructuren van het blad de tripsbeweging remden. Naast het vormen van een fysieke barrière, kunnen papillen secundaire metabolieten bevatten. Cardinosine A, een asparaginezuurproteïnase, waarvan wordt aangenomen dat het betrokken is bij de afweer van planten tegen pathogenen, wordt opgeslagen in de stigmatische papillen van *Cynara cardunculus* L. (Ramalho-Santos et al., 1997). We verwachtten daarom dat Gladiolus-variëteiten met hogere dichtheden van papillen grotere hoeveelheden afweerstoffen bevatten.

Om die reden hebben we onze studie uitgebreid met experimenten die een bredere scala aan variëteiten omvatten en die gericht waren op het metabooloom van de plant (hoofdstuk 3). Eerst hebben we gekeken of het plantmetabooloom betrokken was bij tripsresistentie door de effecten van de bladextracten van de variëteiten van de vorige experimenten op tripssterfte te testen in een in vitro experiment. Tripssterfte in dit

experiment was sterk negatief gecorreleerd met zilverbeschadiging in de bio-toets van de hele plant. Vervolgens gebruikten we veertien soorten dwerggladiolen van gemiddelde tot grote grootte om metabolieten te onderzoeken die geassocieerd zijn met tripsresistentie en -gevoeligheid. NMR-gebaseerde metabolomics gaven aan dat twee niet-geïdentificeerde triterpenoïde saponinen (signaal A en signaal B), twee aminozuren (alanine en threonine) gerelateerd waren aan tripsresistentie. Al deze inhoudsstoffen waren sterk gecorreleerd met elkaar en met de dichtheid van papillen. Daarentegen waren er geen inhoudsstoffen significant gecorreleerd met gevoeligheid, hoewel ze werden geïdentificeerd als VIP's in multi-variate toetsen. De correlaties tussen de concentraties van de inhoudsstoffen gerelateerd aan resistentie en de dichtheid van papillen suggereert sterk dat de papillen dienen als opslagorgaan van inhoudsstoffen die bijdragen aan resistentie of dat deze stoffen door de papillen worden geproduceerd. De sterke correlatie tussen hen maakt het echter onduidelijk wat hun relatieve bijdragen aan resistentie zijn. Saponinen bleken belangrijk te zijn als chemische afweerstof in *Aesculus pavia* tegen de mineervlieg *Cameraria ohridella* (Ferracini et al., 2010), in *Barbarea vulgaris* tegen de vlokever *Phyllotreta nemorum* (Kuzina et al., 2009) (Nielsen et al., 2010). De alanineconcentratie was hoger in een perzikenas dat resistent was tegen de mediterrane fruitvlieg (*Ceratitis capitata*), terwijl voor threonine een dergelijk verschil niet werd waargenomen (Capitani et al., 2012). Dillon en Kumar (Dhillon en Kumar, 2017) rapporteerden daarentegen dat de threonine-concentratie significant hoger was in zaailingen van tweekleurige Sorghum die resistent zijn tegen de stengelboorder *Chilo partellus* dan in de zaailingen van een vatbaar ras, terwijl de alanineconcentraties niet significant verschilden. Een dergelijk verschil in de bioactiviteit van een bepaalde inhoudsstof tussen verschillende plantensoorten is niet ongebruikelijk en kan het gevolg zijn van het feit dat meestal multivariate correlaties worden gebruikt en de concentraties van plantmetabolieten onderling sterk gecorreleerd zijn. Als alternatief kunnen deze verschillen in bioactiviteit van inhoudsstoffen tussen plantensoorten het gevolg zijn van synergetische of antagonistische effecten met de achtergrondmetabolieten. Papillen als opslagplaatsen van secundaire plantafweerinhoudsstoffen zijn gerapporteerd in rijst (Wakte et al., 2007) en kardoos (Ramalho-Santos et al., 1997). Onze studie suggereert dat chemische inhoudsstoffen die in papillen zijn opgeslagen, resistentie kunnen verlenen aan gladiolen. Dit biedt een kans voor verder onderzoek naar de mechanismen die betrokken zijn bij resistentie tegen trips. Op dit punt moeten we echter voorzichtig zijn, omdat we een correlatieve studie hebben uitgevoerd en correlatie betekent niet altijd een causaal verband. Zo kunnen andere bijbehorende kenmerken betrokken zijn bij het resistentiemechanisme. Ondertussen kunnen de dichtheid van papillen en/of de geïdentificeerde inhoudsstoffen gemakkelijke morfologische en/of chemische markers opleveren in veredelingsprogramma's voor gladiolen die gericht zijn op verhoogde resistentie tegen trips.

Markers voor resistentie in kweekprogramma's moeten relevant zijn gedurende in meerdere groeifases van de plant en onder verschillende omgevingsomstandigheden. De chemische afweer kan echter veranderen naarmate planten groeien, beginnend in de zaailingfase, via de vegetatieve juveniele fase naar de reproductiefase. Ontogenetische verschuivingen in verdedigingskenmerken kunnen worden geassocieerd met dramatische veranderingen in niveaus van ervaren herbivorie (Boege en Marquis, 2005). Bovendien kan de resistentie van planten tegen herbivoren, die meestal onder gecontroleerde omstandigheden in klimaatcellen is bestudeerd, verschillen wanneer deze wordt bestudeerd onder natuurlijke groeiomstandigheden in het veld, waar omstandigheden zoals fotoperiode, lichtintensiteit, temperatuur en vochtigheid dagelijks variëren. Daarom hebben we in hoofdstuk 4 tripsresistentie vergeleken tussen 3 ontwikkelingsstadia van de plant: vegetatief, generatief stadium met knoppen en generatief stadium met bloemen. Ten tweede hebben we de resistentie vergeleken tussen planten die onder natuurlijke omstandigheden op de locatie van een veredelaar waren gekweekt en die voor de resistentietest naar een klimaatkamer werden overgebracht, en planten die gedurende het hele experiment in een klimaatkamer waren gekweekt. Voor deze studie werden de *Gladiolus*-variëteiten Robinetta en Charming Beauty gebruikt, die respectievelijk zeer resistent en zeer vatbaar waren in de vegetatieve fase. Robinetta vertoonde meer dan 500 keer minder schade dan Charming Beauty met consistente verschillen in tripsresistentie over alle ontwikkelingsstadia. Metabole profielen verschilden tussen de twee variëteiten in alle drie de plantstadia. Triterpenoïden, saponinen en aminozuren werden aangewezen als metabolieten die geassocieerd zijn met het resistente ras, zoals in het vorige hoofdstuk. Threonine was 10 keer hoger en triterpenoïde saponinen, valine en alanine waren ongeveer vijf keer hoger in Robinetta. In Charming beauty, de vatbare cultivar, waren de bladeren meer beschadigd dan de knoppen en bloemen. Bladeren vertegenwoordigen echter een relatief groot oppervlak in vergelijking met knoppen en bloemen, zodat verschillen in tripsschade tussen organen mogelijk niet alleen kon worden toegeschreven aan variatie in metabolieten. Hoewel de zilverschade op bladeren hoger was in de vegetatieve fase dan in de twee generatieve stadia, zagen we geen significante verschillen in bladmetabolieten gerelateerd aan resistentie (of gevoeligheid) tussen bladeren van verschillende ontwikkelingsstadia. Terwijl in Robinetta de schade altijd veel lager was, waren alle concentraties van de inhoudsstoffen die we in hoofdstuk 3 identificeerden als gerelateerd aan resistentie in het vatbare ras Charming Beauty veel hoger. In Robinetta waren de relatieve concentraties van de triterpenoïden saponinen (signalen A en B) hoger in bladeren en knoppen dan in bloemen, terwijl de concentraties van threonine, alanine en valine veel hoger waren in bladeren en knoppen dan in bloemen. Zoals verwacht, is de concentratie van inhoudsstoffen die gerelateerd waren aan afweer in hoofdstuk 3 van dit proefschrift hoger in knoppen en bloemen dan in bladeren in de vatbare variëteit Charming Beauty. Het hebben van een hogere concentratie aan afweerstoffen zoals alanine en threonine in knoppen en bloemen is een manier om de meest waardevolle

organen met betrekking tot plantfitness te beschermen tegen trips. Ook Damle et al. (2005) rapporteerden een accumulatie van proteïnase-remmers in bloemen als bescherming tegen *Helicoverpa armigera* op tomaat (*Lycopersicon esculentum* Mill). Het patroon van schade aan plantorganen in Charming Beauty contrasteerde met chrysant, waarop trips de voorkeur gaf aan bloemen boven bladeren (De Jager et al., 1993). Verschillen in resistentie tussen het vatbare ras Charming Beauty en het resistente ras Robinetta bleven constant in de ontwikkelingsstadia. Bovendien vonden we geen verschillen in resistentie van bladeren tussen ontwikkelingsstadia voor beide variëteiten, wat gepaard ging met het ontbreken van verschillen tussen ontwikkelingsstadia van metabolieten in bladeren die in het vorige hoofdstuk als geassocieerd met resistentie werden geïdentificeerd. Samen suggereren deze resultaten sterk dat markers voor resistentie in vroege ontwikkelingsstadia geldig blijven gedurende het hele leven van de plant.

In het tweede deel van dit hoofdstuk onderzochten we het effect van omgevingscondities op tripsresistentie. De omgeving had duidelijk invloed op de metabole profielen. Fenolen zoals flavonoïden kaempferol, apigenine en luteoline, evenals enkele organische zuren zoals mierenzuur, galluszuur en appelzuur waren inhoudsstoffen die werden beïnvloed door de groeiomstandigheden. Het was duidelijk dat de lichtintensiteit in de klimaatkamer lager was dan onder veldomstandigheden die mogelijk de chemische variatie veroorzaakten. Luteoline en apigenine waren hoger onder veldomstandigheden en in planten die van het veld naar de klimaatkamer werden overgebracht dan in planten die in de klimaatkamer werden gekweekt. Markham et al. (Markham et al., 1998) rapporteerden dat in de thallus van het gewone levermos, *Marchantia polymorpha*, de flavonoïden, luteoline en apigenine, toenamen met hogere UV-B-niveaus. Kaempferol was meer aanwezig in planten die in de klimaatcel waren opgekweekt. Dit laatste is in lijn met de resultaten van Muller et al. (2015) voor de meerjarige semi-aquatische plant *Hydrocotyle leucocephala* met een hogere kaempferolconcentratie voor planten die in klimaatkamers worden gekweekt. Mierenzuur, galluszuur en appelzuur waren hoger in planten die in de klimaatkamer werden gekweekt, terwijl Jankanpaa et al. (Jänkänpää et al., 2012) meldden dat appelzuur overvloediger voorkwam in *Arabidopsis* met veel licht dan in planten met weinig licht. Concentraties van metabolieten waarvan eerder werd vastgesteld dat ze verband hielden met tripsresistentie (triterpenoïde saponinen, alanine en threonine) waren vergelijkbaar in elk van de drie omgevingen, terwijl de verschillen tussen de twee variëteiten constant bleven. Bijgevolg leek het milieu geen invloed te hebben gehad op de inhoudsstoffen die verband houden met tripsresistentie in *Gladiolus*. Met andere woorden, resistentie bij *Gladiolus* lijkt voornamelijk genetisch bepaald zonder een sterke genotype-omgeving interactie. Aminozuren behoren tot de primaire metabolieten en maken deel uit van het primaire metabolisme van planten, dat verantwoordelijk is voor de groei en ontwikkeling.

Aminozuren werden gerapporteerd door Jankanpaa et al. (2012) als lichtintensiteitsafhankelijke stoffen in *Arabidopsis thaliana*. Valine was opvallend hoger in planten die onder omstandigheden met weinig licht ($30 \mu\text{mol fotonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) werden gekweekt, alanine had hogere concentraties bij veel licht ($600 \mu\text{mol fotonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en normaal licht ($300 \mu\text{mol fotonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Threonine had zich in *Arabidopsis* één uur na het overbrengen van een groeikamer naar het veld opgehoopt. In de huidige studie waren alanine, valine en threonine iets lager in de klimaatkamer. Al met al laten deze resultaten zien dat verschillen in plantafweerstoffen die verband houden met tripsresistentie tussen een resistente en een vatbare variëteit blijven bestaan tijdens de ontwikkeling van de plant en onder verschillende groeiomstandigheden.

Constitutieve afweermechanismen, zoals bestudeerd in de vorige hoofdstukken, worden geacht duur te zijn voor planten, aangezien hun biosynthese energie kost (Boege en Marquis, 2005). Om die reden worden verdedigingssystemen in planten vaak pas ingeschakeld bij een daadwerkelijke aanval door een plaag of ziekte. Dergelijke geïnduceerde afweermechanismen zijn bekend voor vele plantensoorten. Daarom hebben we zes variëteiten *Gladiolus nanus* met en zonder tripsplaag gebruikt om de resistentie van waardplanten tegen trips te onderzoeken en om te onderzoeken of de inhoudsstoffen die we in de vorige hoofdstukken met resistentie en vatbaarheid voor trips in verband brachten, ook door trips werden geïnduceerd. We bevestigden dat constitutief resistente variëteiten hogere niveaus van triterpenoïden hadden, evenals enkele aminozuren (alanine, valine en threonine). Bovendien ontdekten we dat kaempferol geassocieerd was met resistentie in *Gladiolus nanus*. Leiss et al. (2009) en Kirk et al. (2005) ontdekten dat kaempferol glycoside hoger was in genotypen van *Jacobaea vulgaris* die resistent waren tegen *F. occidentalis*. Ook was de kaempferolconcentratie twee keer hoger in ogenbonenlijnen (*Vigna unguiculate* L. Walp.) die resistent waren tegen luizen (*Aphis fabae*) (Lattanzio et al., 2000). Wu et al. (2007) meldden dat kaempferolglycosiden *Thrips palmi* in guldenroede (*Solidago altissima* L.) afschrikken.

Planten moeten zich tegen aanvallen verdedigen middels verdedigingsroutes die per plaag of ziekte kunnen verschillen. Als gevolg hiervan zijn trips, naast de hierboven genoemde triterpenoïde saponinen en aminozuren, resistent tegen de fenolverbinding kaempferol als een van de resistente metaboliëten die typisch in *Gladiolus nanus* voorkomen. Fenolen zoals kaempferol-glycosiden vertonen een tegenovergesteld patroon als reactie op infectie met *Spodoptera littoralis* in maïs (Marti et al., 2013). Kaempferol 3-O-rutinoside was verminderd bij aanvallen van herbivoren. Forkner et al. (2004) rapporteerden dat tannines net als fenolen functioneren als anti-stoffen tegen de bladeteende insecten *Acrinicta increta* (Noctuidae) en *Attelabus sp.* (Curculionidae) op *Quercus velutina* en *Q. alba*. Metaboliet profielen van verschillende soorten *Gladiolus* werden duidelijk van elkaar gescheiden in multivariate analyses, zowel voor als na het inbrengen van trips. Daarentegen werden metaboliet-profielen niet duidelijk beïnvloed

door de aanwezigheid van trips. Het is mogelijk dat trips slecht een klein deel van het blad beschadigen, waardoor de afweer enkel lokaal wordt aangeschakeld en dus de metaboliet profielen alleen lokaal veranderen. De lokale veranderingen na de beperkte schade kunnen echter verloren gaan in het algehele metaboliet karakterisering. Metaboliet profielen werden bepaald op basis van een monster van een geheel blad. Voor de meest gevoelige cultivar (Charming Beauty) die tripsschade vertoonde over de hele plant, sluit dit hoogstwaarschijnlijk de mogelijkheid uit dat lokale afweerinductie heeft plaatsgevonden. Voor de meest resistente cultivar Robinetta met zeer lokale tripsschade kunnen we deze mogelijkheid niet uitsluiten en zou meer analyse nodig zijn om te onderzoeken of het selecteren op verhoogde lokaal geïnduceerde afweer zou kunnen leiden tot een significante vermindering van de schade. Een beperking van deze studie is dat aanschakeling van de afweer slechts op één moment in de tijd werd gemeten. Misschien zou op een eerder of later moment na infectie wel een zekere mate van verandering in metaboliet-profielen kunnen worden waargenomen.