



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Systematics, epidermal defense and bioprospecting of wild orchids**

Kusuma Wati, R.

### **Citation**

Kusuma Wati, R. (2021, March 25). *Systematics, epidermal defense and bioprospecting of wild orchids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3157143>

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/1887/3157143>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3157143> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Kusuma Wati, R.

**Title:** Systematics, epidermal defense and bioprospecting of wild orchids

**Issue Date:** 2021-03-25

## Samenvatting

Indonesië bestaat uit 17,000 eilanden, die tussen het vasteland van Azië en Australië liggen in de Pacifische en Indische oceaan. Het land bevat na Brazilië het hoogste aantal planten- en diersoorten ter wereld, en zelfs de meeste soorten als ook al het mariene leven binnen de territoriale wateren wordt meegeteld. Van alle landplanten komt een kwart alleen in Indonesië voor. Met meer dan 7,600 soorten orchideeën, verspreid over de zeven fyto geografische regio's, draagt de Indonesische flora voor meer dan een derde bij aan alle soorten van deze plantenfamilie. Gedurende de afgelopen twee eeuwen veranderde het onderzoek aan Indonesische orchideeënsoorten langzaam van het ontdekken en beschrijven van nieuwe soorten in het behouden van soorten en het ontdekken van interacties van soorten met hun omgeving.

Dit proefschrift getuigt van bovenbeschreven verandering van focus in het onderzoek aan Indonesische orchideeënsoorten. In hoofdstuk 2 presenteer ik een interactieve determinatiesleutel in twee talen (<http://glomera.linnaeus.naturalis.nl>), die online gebruikt kan worden. Naast een web browser hoeven voor deze sleutel geen extra programma's geïnstalleerd te worden. De determinatiesleutel bevat kenmerken van 169 soorten van *Glomera*, een genus binnen de Coelogyninae (Epidendroideae). Van deze groep orchideeën was nog geen compleet overzicht beschikbaar. Met de determinatiesleutel kunnen soorten op naam gebracht worden met een combinatie van kenmerken van het rhizoom, de stengels, bladeren, pseudobulben en bloemen, aangevuld met gegevens over geografische verspreiding en ecologie. In dit hoofdstuk vraag ik iedereen, met een passie voor wilde orchideeën uit Zuidoost Azië, om de sleutel verder te helpen verbeteren met aanvullingen in bijvoorbeeld verspreidingsdata. Zo kunnen we een vollediger beeld krijgen van de zeldzaamheid van soorten en het uitsterven van die soorten helpen voorkomen.

In hoofdstuk 3 presenteer ik een oplossing voor een belangrijke uitdaging van ex situ orchideeëncollecties in botanische tuinen: het niet in bloei komen van in het wild verzamelde planten. Veel orchideeënsoorten komen pas in bloei bij een hele specifieke combinatie van temperatuur, vochtigheid, licht en nutriëntenconcentraties. Die combinatie is vaak heel moeilijk na te bootsen in een kas. Veel in het wild verzamelde planten gaan dan ook dood of komen nooit

in bloei in een levende collectie. Zonder bloemen zijn veel orchideeënsoorten lastig op naam te brengen omdat de meeste determinatiesleutels bloemkenmerken bevatten. DNA barcodes, gegenereerd uit op naam gebrachte typecollecties met bloemen, kunnen in dit geval het identificeren van niet bloeiende planten in levende collecties helpen bespoedigen. Collectiebeheerders geven echter meestal geen toestemming voor het destructief bemonsteren van type materiaal. De meeste herbaria reageerden dan ook negatief op een dergelijk verzoek maar uiteindelijk kreeg ik gelukkig toestemming om wat kleine stukjes blad te mogen bemonsteren van type collecties van verschillende *Glomera* soorten uit het herbarium van Naturalis Biodiversity Center en het Herbarium Bogoriense, en wel van herbariumexemplaren met relatief veel bladmateriaal. Het oudste exemplaar is 194 jaar geleden verzameld. Uit die stukjes blad heb ik DNA geëxtraheerd en de nrITS regio's geamplificeerd en gesequenced met behulp van vier primer combinaties. Door de gegenereerde Sanger sequenties te vergelijken met DNA barcodes van levend maar niet bloeiend materiaal, konden enkele planten uit de collecties van de Hortus botanicus in Leiden en Kebun Raya in Bogor met een zekerheid van 100% op naam gebracht worden. Voor een aantal andere exemplaren met afwijkende DNA barcodes geldt wellicht dat het om nog niet beschreven soorten gaat. Met de door mij toegepaste DNA barcodingmethode van type collecties kunnen niet bloeiende planten dus op naam gebracht worden. Ik pleit dan ook voor een versoepeling van het huidige beleid ten aanzien van destructieve bemonstering van type exemplaren. Immers, met DNA barcodes van type collecties kan meer inzicht verkregen worden in de huidige verspreiding van zeldzame soorten zodat ze beter beschermd kunnen worden.

Als een orchidee met vindplaatsgegevens in een levende collectie éénmaal op naam is gebracht kan zo'n plant gebruikt worden voor de productie van zaden en kiemplanten voor herintroductie in de natuur als de soort ter plekke dreigt uit te sterven of al uitgestorven is. Voor dit type herstelbeheer zijn langlevende en gezonde planten nodig in ex situ collecties want het duurt een aantal jaar voordat een geherintroduceerde populatie het verder redt in situ zonder het bijplanten van extra kiemplanten. In hoofdstuk 4 presenteer ik een oplossing voor een andere uitdaging van levende orchideeëncollecties, namelijk het overleven van herbivorie. Tijdens veldwerk in Ambon viel het mij op dat sommige orchideeën minder worden gegeten door herbivoren dan andere soorten. Om uit te zoeken hoe orchideeën

zich tegen herbivoren beschermen is een multidisciplinaire aanpak nodig. Ik heb daarom anatomisch en histologisch onderzoek aan haren en waslaagjes op de epidermis gecombineerd met gedragsexperimenten van herbivoren. In dit onderzoek laat ik voor het eerst zien dat de terrestrische orchideeënsoorten *Orchis mascula* en *Calanthe triplicata*, de eerste bladverliezend, de tweede niet, zich heel anders tegen herbivore landslakjes verdedigen dan de twee niet bladverliezende epifytische soorten *Dendrochilum pallidiflavens* en *Trichotosia ferox*. De waslaag en haren van deze orchideeënsoorten zijn onderzocht met zowel lichtmicroscopie, als scanning en transmissie elektronenmicroscopie. In een ‘cafeteria’ experiment werd jong blad van *Calanthe triplicata* aangeboden aan de herbivore slakkensoort *Subulina octona*. De haren op dit blad waren in de helft van het aangeboden materiaal van te voren met een aansteker weggebrand. De schade, veroorzaakt door herbivorie, was aanzienlijk groter in het bladmateriaal zonder haren. Krachten, nodig om *Subulina octona* en *Pleurodonte isabella*, twee slakkensoorten met respectievelijk veel en weinig windingen in de huisjes, van orchideeënblad te verwijderen, zijn vervolgens vastgesteld met een draaitafel met gesynchroniseerde belichting. Slakken werden evenwijdig of parallel aan de primaire nerven op een vers geplukt orchideeënblad gezet, en dit zowel op de onderkant als op de bovenkant van het blad. Vervolgens werd de centrifuge aangezet en steeds sneller rondgedraaid totdat de slak losliet. De gemeten waardes lieten zien dat de microstructuur van een waslaag bescherming biedt tegen de kleinere slakkensoort. Verder was aanmerkelijk minder kracht nodig om slakken te verwijderen van blad bedekt met een waslaag of een hoge dichtheid aan haren gevuld met lignine. Op basis van deze resultaten adviseer ik om exemplaren van de onderzochte soorten te selecteren met een dikkere waslaag of dichtere beharing voor betere bescherming tegen herbivore slakken in veredelings- en herintroductieprogramma’s.

Een laatste uitdaging van levende orchideeëncollecties betreft de vele uren fysieke arbeid die jaarlijks nodig zijn om planten in leven te houden. Iedere plant heeft een specifieke combinatie van water, bemesting, licht en schaduw nodig, naast een regelmatige controle op herbivorenschade. Dit werk kan niet geautomatiseerd worden. In hoofdstuk 5 presenteer ik een potentiële extra bron van inkomsten om de onderhoudskosten van arbeidsintensieve levende plantencollecties deels mee te bekostigen. Extra inkomsten kunnen worden

gegenereerd uit een vernieuwende publiek-private samenwerking op het gebied van bioactieve inhoudsstoffen uit orchideeën. Coelogyninae orchideeën worden al eeuwenlang gebruikt als traditioneel medicijn. Eerder uitgevoerde bioassays met slechts een paar soorten lieten al veelbelovende resultaten zien. Extracten van deze orchideeën hebben antimicrobiële en koortswerende eigenschappen en kunnen als antioxidant functioneren. Geen van deze soorten was echter al ethnobotanisch onderzocht in een fylogenetische context. Ik heb dat laatste gedaan en daarbij twee indelingen met elkaar vergeleken: de op organen gebaseerde Economische Botanie Data Collectie Standaard (EBDCS) en de biologische responsmethode. Traditioneel medicinaal gebruik van Coelogyninae werd eerst uit de literatuur verzameld. Vervolgens heb ik bioassays uitgevoerd met een selectie aan antibiotica resistente lijnen van humaan pathogene microbes en extracten verkregen uit blad en pseudobulben van twee soorten Coelogyninae: *Coelogyne cristata* en *C. fimbriata*. Er zijn extracten gebruikt van planten die onder glas gekweekt werden en van planten die gekweekt werden in de buitenlucht. Een moleculaire fylogenie van 148 soorten Coelogyninae, gebaseerd op DNA sequenties van nucleaire rITS en chloroplast matK markers, is gebruikt om het traditionele medicinale gebruik in een fylogenetische context te plaatsen. Voor 28 soorten Coelogyninae is het traditioneel gebruik ingedeeld volgens de EBDCS methode, met 19 categorieën, en de biologische responsmethode, met drie categorieën. Met behulp van ethanol geëxtraheerde inhoudsstoffen van het blad van *Coelogyne cristata* en *C. fimbriata* remden de groei van *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* en *Yersenia enterocolitica*. Dit bevestigde het traditioneel medicinaal gebruik zoals beschreven in de literatuur. Extracten van in openlucht gekweekte planten bleken een sterkere antimicrobiële werking te hebben dan extracten van onder glas gekweekte planten. Met de EBDCS methode werden slechts drie clades met een hoge kans op soorten met antimicrobiële eigenschappen ontdekt, terwijl met de biologische responsmethode maar liefst acht clades werden gevonden. Mijn conclusie is dan ook dat de laatste methode effectiever is. Mijn advies is om de biologische responsmethode nu ook toe te passen op andere orchideeëngroepen met veel vertegenwoordigers in Indonesië. Zo kunnen nieuwe toepassingen gevonden worden voor de bioactieve inhoudsstoffen van deze soorten om hiermee de kosten van het onderhoud van een levende collectie deels terug te verdienen.