

# Genetica, chemie en ecologie van een kwalitatief glucosinolaatpolymorfisme in barbarakruid (*Barbarea vulgaris*)

Hanneke van Leur

Op 17 maart 2008 promoveerde Hanneke van Leur aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Genetics, chemistry and ecology of a qualitative glucosinolate polymorphism in *Barbarea vulgaris*'. Promotoren waren Prof. Dr. Ir. W.H. van der Putten van de leerstoelgroep Nematologie en Prof. Dr. L.E.M. Vet van de leerstoelgroep Entomologie. Co-promotor was Dr. Ir. N.M. van Dam, van de werkgroep Multitrofe Interacties van het Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO-KNAW) waar tevens het onderzoek werd uitgevoerd. Het onderzoek werd gefinancierd door het ALW-programma van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO).

een geschikte waardplant. Op deze aangepaste herbivoren hebben glucosinolaten juist een aantrekkende en vraatstimulerende werking. De omzettingsprodukten veroorzaken ook de smaak van de vele kool- en mosterdsoorten die voor menselijke consumptie worden gebruikt. Er zijn meer dan 100 verschillende glucosinolaten, die elk een verschillende chemische structuur hebben. Die structuur is bepalend voor het eindproduct dat gevormd wordt bij het beschadigen van de plant. Elke plantensoort heeft zijn eigen typische samenstelling van glucosinolaten. Het doel van dit proefschrift was te onderzoeken of de verschillen in glucosinolaatprofiel ook van invloed zijn op de resistentie tegen planteneters.

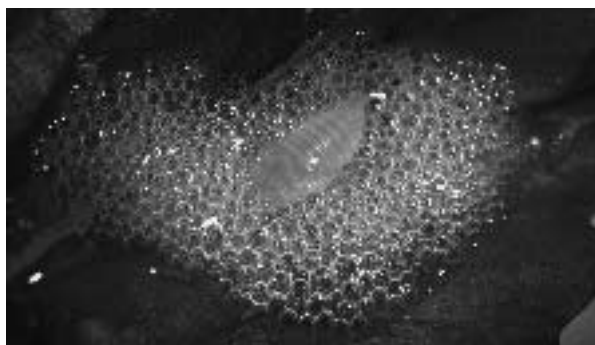
## Verdedigen met een wapenarsenaal aan glucosinolaten

Net als veel andere plantensoorten, verdedigt gewoon barbarakruid (*Barbarea vulgaris*) zich met chemische afweerstoffen tegen belagers. Hiertoe produceert het barbarakruid zogenaamde glucosinolaten. Deze stoffen komen voor in veel kruisbloemigen, zoals koolsoorten, mosterd en de wetenschappelijke modelplant zandraket (*Arabidopsis thaliana*). Glucosinolaten vormen samen met een enzym, myrosinase, een twee-componentensysteem: het enzym en de glucosinolaten zijn gescheiden opgeslagen, maar als het blad beschadigd wordt, komen ze bij elkaar en worden de glucosinolaten door het enzym omgezet. Voor generalistische belagers zijn de glucosinolaten en de omzettingsprodukten vaak giftig, waardoor ze vraatschade aan planten tegengaan. Specialistische belagers kunnen deze stoffen daarentegen gebruiken als kenmerk voor

## In Nederlandse populaties komen twee chemotypen van het barbarakruid voor

In een aantal Nederlandse populaties van gewoon barbarakruid is gevonden dat niet alle planten precies dezelfde glucosinolaten maken. Het grootste deel van de planten maakt voornamelijk glucobarbarine, een glucosinolaat dat typisch is voor deze plantensoort en naar het geslacht *Barbarea* vernoemd is. Ook in populaties in Duitsland, België, Frankrijk en Zwitserland werden alleen maar planten met voornamelijk glucobarbarine gevonden. In de helft van de Nederlandse populaties maakte een klein deel van de planten (2-22%) een ander glucosinolaat, gluconasturtiine genaamd. Het verschil in structuur van deze twee glucosinolaten is zeer klein; glucobarbarine heeft slechts één hydroxygroep meer dan gluconasturtiine. Dit kan biologisch gezien echter zeer belangrijk zijn: als gluconasturtiine in contact komt met myrosinase wordt

PROMOTIES



**Figuur 1.** Er zijn gemiddeld 2,4 schuimcicades gevonden op de bloemstengels van *B. vulgaris*-planten met glucobarbarine en 3,7 schuimcicades op het gluconasturtiïne-type.

er een giftig en pittig smakend isothiocyanaat gevormd, terwijl in planten met glucobarbarine, door de positie van de hydroxygroep, zogenaamde oxazolidinethionen ontstaan. Van deze oxazolidinethionen is niet bekend of ze acuut giftig zijn, maar wel dat ze in zoogdieren de opname van jodium remmen, waardoor problemen met de schildklier kunnen ontstaan. Het *B. vulgaris*-glucosinolaatpolymorfisme bestaat dus uit twee chemotypen. In het promotieonderzoek worden de chemotypen van *B. vulgaris* beschreven en wordt het polymorfisme gebruikt om effecten van verschillende glucosinolaten op planteneeters te bestuderen.

Het verschil in glucosinolaatprofiel is consistent aanwezig in alle organen van *B. vulgaris*, maar het verschil is groter in de bovengrondse plantendelen dan in de wortels. Het glucosinolaatprofiel verandert niet wanneer de planten door insecten of kunstmatig, door toevoeging van jasmonzuur, geïnduceerd worden. Met behulp van kruisingsproeven werd aangetoond dat het vermogen om glucobarbarine te produceren erfelijk is en gereguleerd wordt door een dominant gen. Op basis van de aanname dat er een specifiek enzym is dat de hydroxylering van gluconasturtiïne tot glucobarbarine verzorgt, zijn enkele kandidaat-genen geïdentificeerd. Verder onderzoek is nodig om vast te stellen of één van deze kandidaat-genen daadwerkelijk de basis vormt voor het verschil tussen de chemotypen.

### **Welk wapen werkt het best tegen blad- en wortelherbivoren?**

Vervolgens werd onderzocht welk effect het verschil in chemotype heeft op blad- en wortelherbivoren. De planten met glucobarbarine bleken

zeer resistent tegen de generalistische blad-etende rupsen van de mot *Mamestra brassicae*. Slechts enkele rupsen overleefden op planten met glucobarbarine en als ze konden kiezen, hadden ze een sterke voorkeur om te eten van planten met gluconasturtiïne. De vrouwtjesmotten legden echter ongeveer evenveel eitjes op bladeren van beide chemotypen. Rupsen van het specialistische kleine koolwitje groeiden even goed op beide typen planten en maakten ook in de keuzetoets geen onderscheid. De larven van de specialistische koolwortelvlieg deden het echter slechter op wortels van het gluconasturtiïne type dan op wortels van het glucobarbarine type. Ook is gemeten wat het gevolg is voor de plant van een infectie met wortelvliegen. Hieruit bleek dat de massa van de wortels en de scheuten van planten behorende tot beide chemotypen halveerde door de wortelvliegen en dat de gehalten van voedingsstoffen, zoals suikers en aminozuren, afnamen.

### **Van kas naar veld**

Om de resultaten uit de kas beter te kunnen vertalen naar de natuurlijke situatie, werden in een proeftuin planten van beide chemotypen geplant en gedurende twee jaar elke week van het groeiseizoen de aantallen herbivoren geteld. Het bleek dat een aantal bovengrondse insectensoorten wel voorkeur vertoonden voor een bepaald chemotype en andere soorten niet. Vlinders van het kleine koolwitje legden bij voorkeur hun eieren op planten met gluconasturtiïne, maar gespecialiseerde aardvlooien en galmuggen kwamen meer voor op planten met glucobarbarine. Koolluis en perzikluis hadden geen voorkeur en kwamen op beide chemotypen evenveel voor. Drie tot vier keer per jaar werd een aantal planten uitgegraven om de wortelherbivoren en de nematoden in de grond te analyseren. De aantallen en soortensamenstelling van deze ondergrondse organismen verschilden niet tussen de chemotypen.

### **Metabolische analyses: verder kijken dan glucosinolaten**

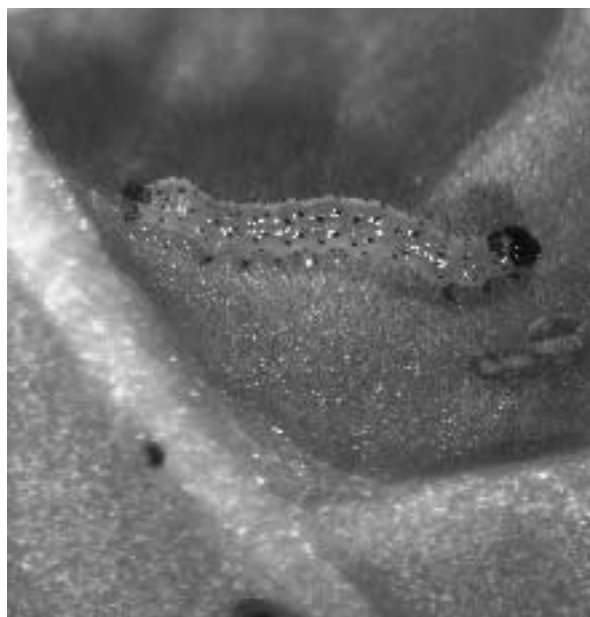
Tenslotte werden uitgebreide metabolische analyses uitgevoerd met behulp van 'liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry' LC-TOF-MS om de chemische verschillen tussen de twee chemotypen nader te onderzoeken. Multivariate analyses toonden aan dat glucosinolaten inderdaad het grootste chemi-

sche verschil tussen de typen veroorzaken en dat deze verschillen groter zijn in de scheut dan in de wortel. Naast de glucosinolaten werden er acht, niet nader geïdentificeerde, stoffen gevonden die in kleine hoeveelheden voorkwamen en verschilden tussen de chemotypen. Bekende afweerstoffen zoals flavonoiden en saponines zijn wel geïdentificeerd, maar verschilden niet in concentratie tussen de chemotypen. Daardoor is het zeer waarschijnlijk dat de verschillen in groei en voorkeur van herbivoren voornamelijk het gevolg zijn van de verschillen in glucosinolaatprofiel.

### **Conclusie**

Op basis van de kas- en veldproeven kan er geconcludeerd worden dat de structuur van de glucosinolaten significante verschillen veroorzaakt in resistentie tegen verschillende herbivoren. Het is echter niet zo dat het ene chemotype in alle gevallen meer resistent is dan het andere chemotype. Welke van de twee chemotypen een voordeel heeft, hangt dus af van welke herbivoren in een bepaalde plantenpopulatie voorkomen. Op deze manier kan het gevonden glucosinolaatpolymorfisme in natuurlijke populaties gehandhaafd blijven.

Nieuw adres Hanneke van Leur: Faculteit biomedische technologie, Technische Universiteit Eindhoven; e-mail: [h.v.leur@tue.nl](mailto:h.v.leur@tue.nl).



**Figuur 2.** De generalistische herbivoor de koolmot (*Mamestra brassicae*) kon zich prima ontwikkelen op *B. vulgaris*-planten met gluconasturtiin maar ging al snel dood op planten met voornamelijk glucobarbarin.

### **Stelling**

Natuur overtreft de techniek: Het bepalen van het glucosinolaatype van gewoon garbarakruid gaat sneller door gebruik te maken van *Mamestra brassicae*-rupsen, dan door het analyseren van bladeren met een HPLC-techniek.