

Die Wirtspflanzeignung von *Arabidopsis*-Ökotypen mit verschiedenen Glucosinolatprofilen für unterschiedlich spezialisierte phytophage Insekten

Inga Mewis & Christian Ulrichs

Institut für Gartenbauwissenschaften, Urbaner Gartenbau,
Humboldt-Universität zu Berlin

Abstract: Host-plant resistance of *Arabidopsis* ecotypes with different glucosinolate profile for different phytophagous insect.

The model plant *Arabidopsis thaliana* (L.) belongs to the family *Brassicaceae*, which is characterized by the glucosinolate(GS)-myrosinase defense system. Indolyl GS are relatively uniform distributed in *A. thaliana* ecotypes while aliphatic GS profiles are diverse. We used ecotypes with different aliphatic GS profile to test the function of such diversity in plant resistance against insects. Main GS detected were: methylsulfinylbutyl GS in Col-0 and AA-0, allyl GS in Cnt-1 and Can-0 as well as 3-hydroxypropyl GS in Ka-0. Corresponding GS hydrolysis products of Col-0 were isothiocyanates, but all other ecotypes produced nitriles (epithionitriles).

Bioassays were conducted with two aphids, the generalist *Myzus persicae* (Sulzer) and the specialist *Brevicoryne brassicae* (L.), two caterpillars, the polyphagous noctuid *Spodoptera exigua* (Hübner) and the oligophagous pierid *Pieris rapae* (L.) as well as one specialist beetle *Phaedon cochleariae* (F.). Significant differences in insect performance on ecotypes were detected for the aphid and caterpillar species but not for *P. cochleariae*. Best insect performance was on AA-0, whereby this ecotype showed lowest aliphatic GS content of ecotypes. Interestingly, caterpillar performances measured as percent weight gain was different on Ka-0 and Cnt-1. *P. rapae* performed worse on Ka-0 and good on Cnt-1 while *S. exigua* weight gain was better on Ka-0 but poor on Cnt-1. Several factors are considered in this study to explain different insect performance on ecotypes: different constitutive GS level, major aliphatic GS produced, and dominant hydrolysis products formed.

Key words: *Arabidopsis*, glucosinolates, *Myzus*, *Brevicoryne*, *Spodoptera*, *Pieris*, *Phaedon*

Dr. I. Mewis* und Prof. Ch. Ulrichs: Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Urbaner Gartenbau, Lentzeallee 55, 14195 Berlin,
*E-mail: inga@entomology.de

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (L.) gehört zur Familie der *Brassicaceae*, welche zur Herbivorenabwehr das Glucosinolat(GS)-Myrosinase-System, auch die Senfölbombe genannt, besitzt. Neben der primären Funktion der GS und korrespondierender Hydrolyseprodukte zur Abwehr von Generalisten unter den Insekten sowie Pathogenen (GIAMOUSTARIS & MITHEN, 1995, TIERENS et al., 2001), nutzen zahlreiche auf *Brassicaceae* spezialisierte Insekten diese Sekundärmetabolite zur Wirtspflanzenfindung und Akzeptanz (RENEWICK, 2002).

Mehr als 120 verschiedene GS wurden bisher beschrieben, welche sich durch die Seitenkettenreste am Aglucon (β -Thioglucosid) unterscheiden (FAHEY et al., 2001). Hierbei werden die GS in drei Klassen unterteilt: 1) in *A. thaliana* zumeist aus Methionin gebildete aliphatische GS, 2) von Tryptophan abgeleitete Indolyl-GS und 3) von Phenylalanin abstammende aromatische GS. Die Indolyl-GS sind uniform verbreitet in der *Brassicaceae*-Familie und normalerweise in allen *A. thaliana*-Ökotypen vorhanden, wobei gezeigt wurde, dass diese stark durch Umweltfaktoren beeinflusst werden (KLIEBENSTEIN et al., 2001, RAYBOLD & MOYES, 2001). Im Gegensatz hierzu ist die aliphatische GS-Zusammensetzung in *A. thaliana*-Ökotypen und *Brassica* sehr variabel, und die Seitenkettenmodifizierung ist stark genetisch determiniert (KLIEBENSTEIN et al., 2001, LI & QUIROS, 2002). Bisher wurde der Funktion aliphatischer GS-Diversität in Bezug auf ihre mögliche Bedeutung für die Resistenz gegenüber Insekten nicht ausreichende Aufmerksamkeit geschenkt.

Deshalb überprüfen wir, ob sich ein unterschiedlicher GS-Phäno- / Genotyp auf die Wirtspflanzeignung für verschiedene spezialisierte phytophage Insekten auswirkt.

Material und Methoden

Arabidopsis-Ökotypen / Chemische Analyse

Für die Experimente wurden fünf Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* (L.) ausgesucht, welche sich nach KLIEBENSTEIN et al. (2001) innerhalb der aliphatischen GS-Zusammensetzung unterscheiden. Hierbei wurden auch die dominierenden, gebildeten Hydrolyseprodukte der GS überprüft, welches außer bei Col-0 Nitrile bzw. Epithionitrile darstellen sollten. Als Ökotypen wurden verwendet: Col-0 (NASC: N1092), AA-0 (N900), Cnt-1 (X, N1635), Can-0 (N1064) und Ka-0 (N1266).

Im Alter von ca. 40 Tagen wurden die Pflanzen der Ökotypen geerntet sowie umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ein Teil der Proben wurde gefriergetrocknet und die GS mittels 70 % Methanol extrahiert. Die Identifizierung sowie Quantifizierung der GS (Desulpho-GS) erfolgte mittels Sinalbin als interner Standard sowie entsprechender Referenzspektren. Die Desulpho-GS-Gehalte der Proben wurden mit HPLC bzw. LC-MS vermessen. Ein Teil der Pflanzen wurde zur Analyse der Abbauprodukte verwendet. Hierfür wurden die Pflanzenproben in Wasser zerkleinert und die Hydrolyseprodukte anschließend in Dichlormethan extrahiert sowie eingengt und folgend mittels GC-MS vermessen.

Insektenbiotests:

Fünf verschieden spezialisierte Insektenarten wurden hinsichtlich der Wirtspflanzeignung der *A. thaliana*-Ökotypen getestet. Hierfür fanden zwei Homoptera-Arten: der Generalist *Myzus persicae* (Sulzer) und der Spezialist *Brevicoryne brassicae* (L.), zwei Lepidoptera-Arten: die polyphage Eule *Spodoptera exigua* (Hübner) und der oligophage Weißling *Pieris rapae* (L.) sowie die spezialisierte Coleoptera-Art *Phaedon cochleariae* (F.) Verwendung. Für die Insektenanzucht fanden Pak-Choi-Pflanzen (*Brassica chinensis*) Verwendung. Die Pflanzen der Ökotypen waren zu Versuchsbeginn ca. fünf Wochen alt. Im Blattläusexperiment erfolgte zu Versuchsbeginn, außer bei den Kontrollpflanzen, der Besatz mit 10 *M. persicae* bzw. *B. brassicae* pro Pflanze (Imagines und N₄, 10 Wiederholungen pro Behandlung). Das Populationswachstum auf den Ökotypen wurde nach sieben Tagen dokumentiert. Bei dem Experiment mit folivoren Insekten wurden die Pflanzen mit jeweils einer *S. exigua* oder *P. rapae*-Larve (L₄) bzw. einem *P. cochleariae* -Käfer besetzt (acht Wiederholungen pro Behandlung). Festgehalten wurden die Gewichtsveränderung (nicht bei *P. cochleariae*) der Insekten innerhalb von 24 Stunden sowie die gefressene Blattfläche. Die Pflanzen befanden sich während des Versuches in Klimakammern bei 22 ± 1 °C, bei einer 12 Stunden Photoperiode und bei 200 µmol m⁻² s⁻¹ Lichtintensität.

Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse fand die Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließenden Mittelwertevergleich (Tukey's Test oder Fisher LSD) Verwendung, wobei das Programm SYSTAT 11.0 genutzt wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Die chemischen Analysen bestätigten ein unterschiedliches GS-Profil der Ökotypen (Abb. 1). Ein ähnliches GS-Profil, mit 4-Methylsulfinylbutyl-GS als Hauptpeak, wurde für Col-0 und Aa-0 festgestellt, wobei Aa-0 den geringsten Gesamt-GS-Gehalt aufwies. Can-0 und Cnt-1 hatten Allyl-GS als Hauptkomponente, was im Falle von Cnt-1 nicht mit KLIEBENSTEIN et al. (2001) übereinstimmt, obgleich das Saatgut direkt von dem Autor (MPI) bezogen wurde. Zur Vereinfachung wurde dieser Ökotyp X hier weiter als Cnt-1 bezeichnet. Ka-0 hatte entsprechend der Literatur 3-Hydroxypropyl-GS als Haupt-GS. Die Analyse der Hydrolyseprodukte ergab, dass außer Col-0 alle Ökotypen hauptsächlich Nitrile bzw. Epithionitrile als Abbauprodukte der GS bilden und nicht Isothiocyanate.

Die Insektenversuche hinsichtlich der Wirtspflanzeignung ergaben für vier Arten signifikante Unterschiede für die sich in den GS-Gehalten unterscheidenden fünf Ökotypen (Abb. 2). Das Populationswachstum der Blattläuse, *M. persicae* und *B. brassicae*, war nach einer Woche signifikant höher an den Ökotypen Can-0 und Aa-0 als an Col-0, Cnt-1 und Ka-0 (Abb. 2 a). Auch die höchste prozentuale Gewichtszunahme der Raupen von *P. rapae* und *S. exigua* am Ökotyp-AA-0 indiziert die vergleichbar geringe Insektenresistenz dieses Ökotyps (Abb. 2 b). Unterschiedlich war die Gewichtszunahme der Raupen

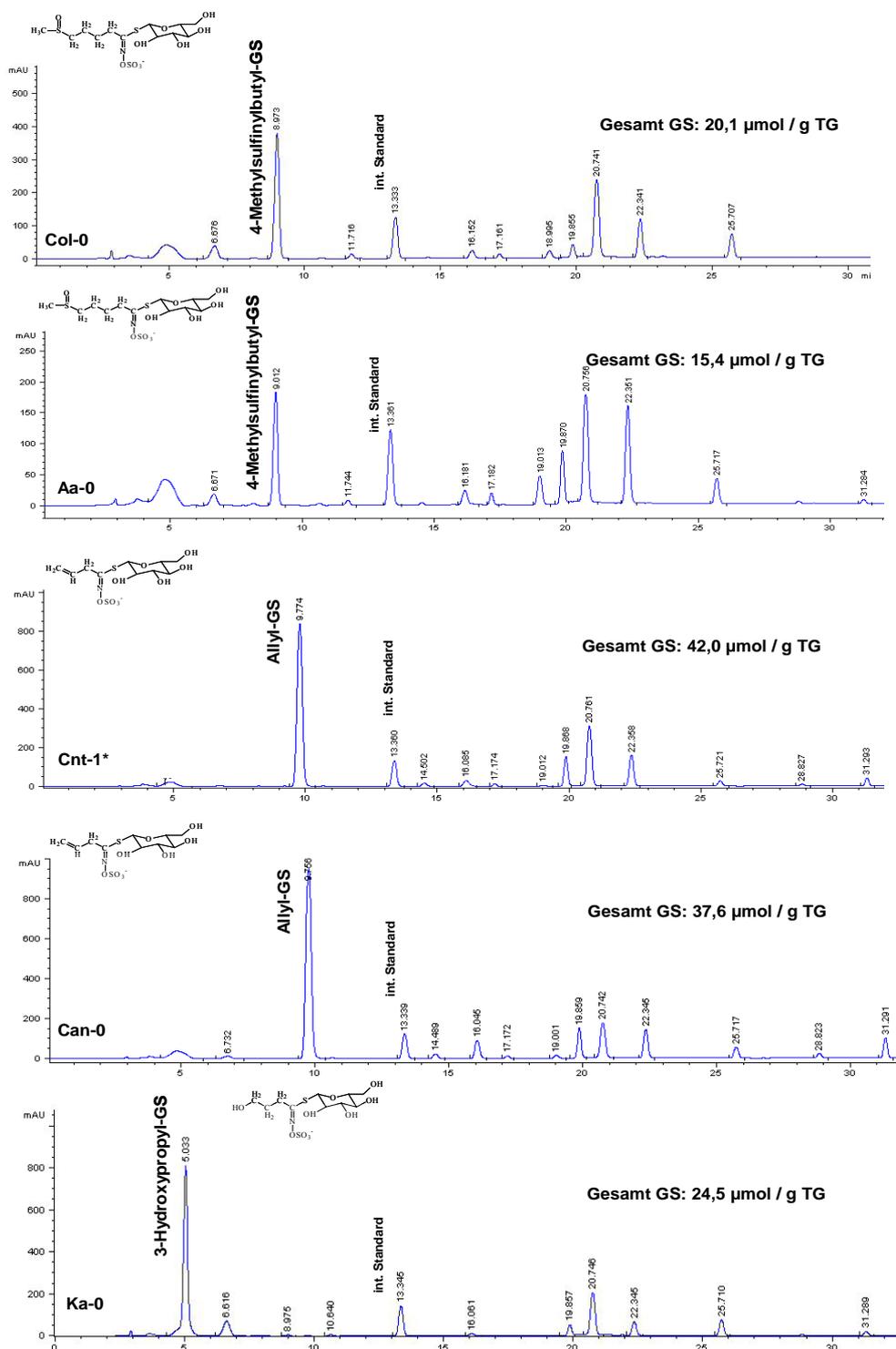


Abb. 1: HPLC-Chromatogramme der fünf Ökotypen, mit gekennzeichnetem aliphatischen Haupt-GS sowie ermitteltem durchschnittlichen Gesamt-GS-Gehalt (Pflanzen sechs Wochen alt, int. = interner).

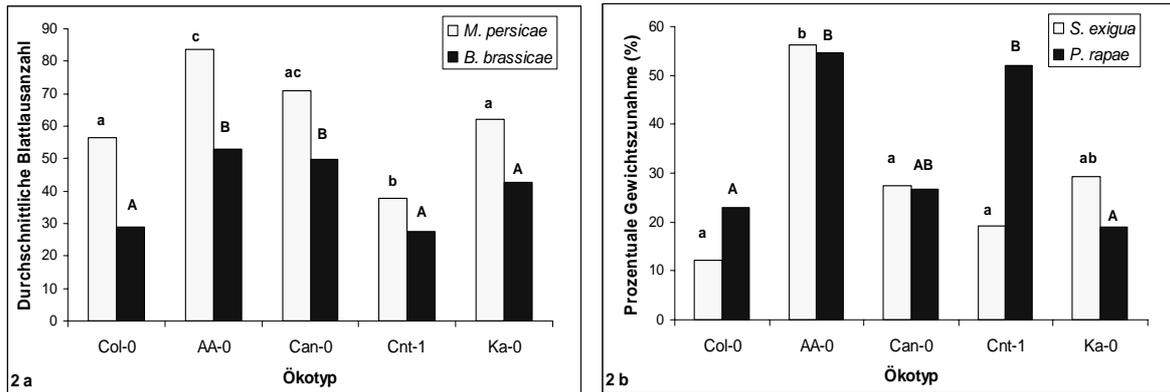


Abb. 2: Wirtspflanzeneignung der Ökotypen für Phloem-saugende und folivore Insekten. 2 a) Populationsgröße von *M. persicae* und *B. brassicae* nach sieben Tagen und 2 b) durchschnittliche prozentuale Gewichtszunahme von *S. exigua*- bzw. *P. rapae*-Larven (L_4) an den Ökotypen. (Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Art, 2 a: Tukey's Test $p \leq 0,05$ bzw. 2 b: Fisher's LSD $p \leq 0,05$)

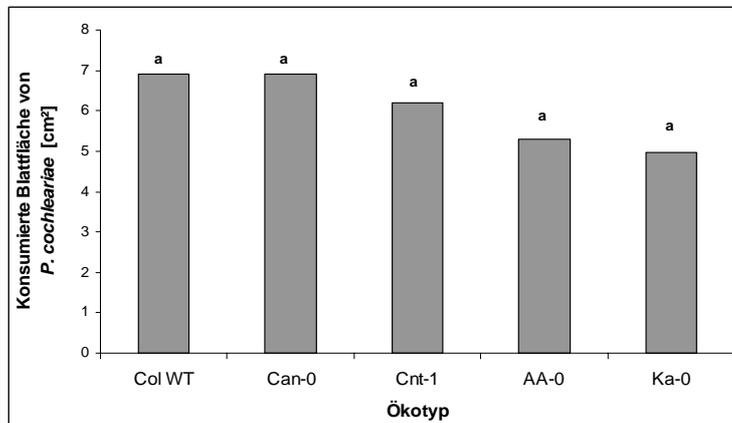


Abb. 3: Fraßschaden von *P. cochleariae*-Käfern an den Ökotypen (Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede innerhalb einer Art, Tukey's Test $p \leq 0,05$)

an Ka-0 und Cnt-1, wobei Ka-0 als Wirtspflanze geeigneter für den Generalisten *S. exigua* bzw. Cnt-0 für den Spezialisten *P. rapae* war. Ein Erklärungsansatz für die unterschiedliche Wirtspflanzeneignung dieser Ökotypen ist die Spezialisierung von *P. rapae* auf GS-haltige Pflanzen, wobei 3-Hydroxypropyl-GS den Ökotyp Ka-0 kennzeichnet und nicht in natürlichen Wirtspflanzen dieser Falterart, wie z. B. *Brassica*, vorkommt (WATZL, 2001). Kein signifikanter Unterschied innerhalb des Fraßschadens an den Ökotypen konnte für *P. cochleariae* festgestellt werden (Abb. 3).

LAMBRIX et al. (2001) zeigte, dass überwiegend Nitril-formende Ökotypen weniger resistent gegenüber Herbivorie des Generalisten *Trichoplusia ni* (Hübner) waren als Ökotypen die als GS-Hydrolyseprodukte überwiegend Isothiocyanate produzieren. Postuliert wurde eine größere Funktion der Isothiocyanate als der Nitrile bei der Insektenabwehr. Dies kann die Ergebnisse nicht alleinig erklären, da nicht alle der vier verwendeten Ökotypen, welche Nitrile als GS-Hydrolyseprodukte bildeten, weniger resistent gegenüber den verschiedenen Insektenarten waren als Col-0. Nur der durch Nitrile gekennzeichnete Ökotyp AA-0 war für die Blattlaus- und Lepidoptera-Arten geeigneter. Dieser Ökotyp wies allerdings auch den geringsten GS-Gehalt auf. Somit bieten die konstitutiven GS-Gehalte sowie das dominierende GS einen besseren Erklärungsansatz für die Insektenresistenz. Experimente mit weiteren Ökotypen sind notwendig, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Danksagung

Für die freundliche Unterstützung gedankt sei: JONATHAN GERSHENZON, JAMES TOKUHISA und MICHAEL REICHELDT vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena sowie TANJA MUCHA von der Humboldt-Universität zu Berlin. Die Arbeit wurde unterstützt durch ein Stipendium des Berliner Programms zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre.

Literatur

- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T. & TALALAY P. (2001): The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. – *Phytochemistry* 56: 5-51.
- GIAMOUSTARIS, A. & MITHEN, R. (1995): The effect of modifying the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* ssp *oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. – *Ann. Appl. Biol.* 126: 347-363.
- LI, G. & QUIROS, C.F. (2002): Genetic analysis, expression and molecular characterization of *BoGSL-ELONG*, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of *Brassica* species. – *Genetics* 162: 1937-1943.
- KLIEBENSTEIN, D.J., KROYMANN J., BROWN, P., FIGUTH, A., PEDERSEN, D., GERSHENZON, J. & MITCHELL-OLDS, T. (2001): Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. – *Plant Physiol.* 126: 811-825.
- LAMBRIX, V., REICHELDT, M., MITCHELL-OLDS, T., KLIEBENSTEIN, D.J. & GERSHENZON, J. (2001): The *Arabidopsis* epithiospecifer protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. – *Plant Cell* 13: 2793-2807.
- RENWICK, J.A.A. (2002): The chemical world of crucivores: lures, treats and traps. – *Entomol. Exp. Appl.* 104: 35-42.
- RAYBOULD, A.F. & MOYES, C.L. (2001): The ecological genetics of aliphatic glucosinolates. – *Heredity* 87: 383-391.
- TIERENS, K.F.M.-J., THOMMA, B.P.H.J., BROUWER, M., SCHMIDT, J., KISTNER, A.P., MAUCH-MANI, B., CAMMUE, B.P.A. & BROEKAERT, W.F. (2001): Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. – *Plant Physiol.* 125: 1688-1699.
- WATZL, B. (2001): Glucosinolate. – *Ernährungsumschau* 48 (8): 330-333.

