

Auswirkungen einer Modifizierung des Glucosinolatprofils von *Arabidopsis thaliana* (L.) auf verschiedene spezialisierte Lepidoptera

Mewis, I.¹, Rohr F.¹, Tokuhisa, J.G.² & Ulrichs, Ch.¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, FG Urbaner Gartenbau
²Virginia Tech University, Horticulture Department

Abstract: Effect of glucosinolate profile modifications in *Arabidopsis thaliana* (L.) on the performance of different specialist Lepidoptera

Plants have developed diverse, complex defense mechanisms for dealing with their enemies. Members of the *Brassicaceae* family use the glucosinolate(GS)-myrosinase system to deal with their enemies. According to their precursor amino acid the GS are classified in aliphatic, aromatic, and indolyl GS. Indolyl GS are widely distributed in *Arabidopsis thaliana* (L.) ecotypes and *Brassica* ssp., but the presence of aliphatic GS is highly variable. The impact of certain GS classes on plant resistance to insects is not yet discovered. Therefore, we studied the host-plant suitability of *A. thaliana* Columbia GS mutants to different Lepidopteran species compared to the wild-type. Two specialist species, *Pieris rapae* L. and *Pieris brassicae* L. and one generalist species *Spodoptera exigua* (Hübner) were selected for the feeding studies. As mutants we used *mam3⁺* with reduced aliphatic GS levels compared to Columbia wild-type and *cyp79B2 cyp79B3⁻* which is characterized by the complete loss of indolyl GS. The weight gain of the generalist *S. exigua* within three days was significantly higher on mutant lines of *mam3⁺* and *cyp79B2 cyp79B3⁻* than on Columbia wild-type. In contrast, the performance of the specialist species *P. rapae* and *P. brassicae* was not different on the genotypes. The reason for different host-plant suitability of mutants for the generalist and specialist insects is discussed.

Key words: *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, *Spodoptera exigua*, *Arabidopsis* mutants, glucosinolates

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

Prof. Dr. J.G. Tokuhisa, Virginia Tech University, Horticulture Department, Blacksburg, VA 24061, USA

Die Glucosinolate (GS) sind charakteristische sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, vorkommend in der Gruppe der *Brassicaceae* und anderen Familien der Ordnung Brassicales (HALKIER & GERSHENZON 2006). Bisher sind mehr als 120 verschiedene GS beschrieben, welche eine gemeinsame Grundstruktur mit variablem Seitenkettenrest kennzeichnet (FAHEY et al. 2001). Je nach chemischer Natur der Seitenkette werden die GS in aliphatische, aromatische und Indolyl-GS unterteilt. Alle GS-enhaltenden Pflanzen besitzen zusätzlich räumlich getrennt von den GS hydrolysierende Enzyme, so genannte Myrosinasen. Erst nach Zellbeschädigung kommen die beiden Komponenten in Kontakt zueinander und weitere biologisch aktive Verbindungen wie z. B. Isothiocyanate und Nitrile werden freigesetzt (RASK et al. 2000). Das GS-Myrosinase-System ist ein effektives Abwehrsystem insbesondere gegenüber generalistischen Insekten, Pathogenen und Bakterien, allerdings dienen vielen spezialisierten Insekten diese Stoffe zur Wirtspflanzenfindung und -akzeptanz (RENWICK 2002, HALKIER & GERSHENZON 2006).

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* L. enthält als Vertreter der *Brassicaceae* GS als Fraßabwehrstoffe. In *A. thaliana* als auch in *Brassica* ist das aliphatische GS-Muster sehr variabel, wohingegen die Indolyl-GS weit verbreitet sind (KLIEBENSTEIN 2001, LI & QUIROS 2002). Allerdings fehlen Studien zur Funktion dieser GS-Klassen innerhalb der Pflanzenresistenz gegenüber Phytophagenfraß. Deshalb wurden zwei *A. thaliana*-Mutanten mit verändertem aliphatischen bzw. Indolyl-GS-Profil im Vergleich zu Columbia WT auf die Wirtspflanzeignung für drei verschiedenen spezialisierte Lepidoptera-Arten getestet.

Material und Methoden

Arabidopsis-Mutanten / Chemische Analyse: Für die Fraßstudien mit Lepidoptera-Larven fanden folgende *Arabidopsis thaliana* L.-Genotypen des Ökotyps Columbia Verwendung (jeweils drei Linien): a) Überexprimierer von *MAM3* (*mam3+*), b) „knock-out“ Mutanten von *CYP79B2* und *CYP79B3* (*cyp-79B2-cyp79B3* von Joanne Chory, „Plant Biology Laboratory“, La Jolla, California) und c) der Wildtyp (WT).

Im Alter von 40 und 44 Tagen wurden die Pflanzen der Genotypen aus den Biotests, einschließlich der Kontrollpflanzen, geerntet sowie umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden gefriergetrocknet und die GS mittels 70 % Methanol extrahiert. Die Identifizierung sowie Quantifizierung der GS (Desulpho-GS) erfolgte mittels Sinalbin als internem Standard sowie entsprechenden Referenzspektren. Die Desulpho-GS-Gehalte der Proben wurden mit HPLC bzw. LC-MS vermessen.

Insektenbiotests: Als Testinsekten zur Untersuchung der Wirtspflanzeneignung verschiedener *Arabidopsis*-Genotypen fanden zwei auf *Brassicaceae* spezialisierte Lepidoptera: *Pieris rapae* L. sowie *P. brassicae* L. und der Generalist *Spodoptera exigua* (Hübner) Verwendung. Zunächst wurden die Larven für vier Tage an den jeweiligen Genotypen in speziellen luftdurchlässigen Insektenkäfigen adaptiert. Dann wurde die Gewichtsveränderung (ca. L_3 -Stadium) innerhalb von drei Tagen Fraß an den Genotypen bestimmt. Bei dem Experiment wurden die Pflanzen mit jeweils einer *S. exigua*-, *P. rapae*- bzw. *P. brassicae*-Larve besetzt (zehn Wiederholungen pro Genotyp und Art). Die Pflanzen befanden sich während des Versuches in Klimakammern bei 22 ± 1 °C, bei einer 12 Stunden Photoperiode und bei $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität.

Statistik: Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse fand die Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Mittelwertevergleich (Tukey's HSD-Test) Verwendung, wobei das Programm SYSTAT in der Version 11.0 genutzt wurde.

Ergebnisse

Der konstitutive GS-Gehalt von Columbia WT betrug $24,5 \mu\text{mol}$ aliphatische GS und $6,1 \mu\text{mol}$ Indolyl-GS pro g Trockengewicht. Ein verändertes aliphatisches GS-Profil war für die *A. thaliana*-Linien von *mam3+* zu verzeichnen, wobei der aliphatische GS-Anteil bis zu 15 % geringer als im WT war. Keine Indolyl-GS enthielten die Linien der „Doppelknockout“-Mutante, *cyp79B2-cyp79B3*, bei einem gleich bleibenden aliphatischem GS-Gehalt. Der GS-Phänotyp der Pflanzen aus den Biotests entsprach dem jeweiligen GS-Genotyp.

Die Auswertung der Fraßstudien ergab Unterschiede hinsichtlich der Wirtspflanzeneignung der Genotypen für die unterschiedlich spezialisierten Lepidoptera. Für die Raupen des polyphagen Schädling *S. exigua* waren signifikant höhere Gewichtszunahmen als an Columbia WT nach Herbivorie an *mam3+* und *cyp79B2-cyp79B3* zu verzeichnen (Abb. 1 c). Die höchste Gewichtszunahme (12 mg) innerhalb von drei Tagen erfolgte auf *mam3+*, welche im Vergleich zu dem WT doppelt so hoch war. Für die oligophagen Schädlinge *P. rapae* (Abb. 1 a) und *P. brassicae* (Abb. 1 b) konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Larvengewichtszunahme an den verschiedenen Genotypen festgestellt werden.

Diskussion

Das charakteristische Abwehrsystem der *Brassicaceae* ist insbesondere Effektiv gegenüber generalistischen Insekten, allerdings nutzen viele Spezialisten die GS und deren Abbauprodukte als Ovipositionsstimulanz bzw. Fraßstimulanz zur Identifizierung der Wirtspflanze (HALKIER & GERSHENZON 2006). Dementsprechend konnte für den Generalisten *S. exigua* nachgewiesen werden, dass sich der geringere sowie veränderte GS-Gehalt in den Mutanten *mam3+* und *cyp79B2-cyp79B3* im Vergleich zum WT positiv auf die Wirtspflanzeneignung von *A. thaliana* Columbia auswirkte. Hierbei beeinflussten beide GS-Klassen, aliphatische GS als auch Indolyl-GS, die Wirtspflanzeneignung gleichermaßen.

Für die auf *Brassicaceae* spezialisierten Insekten *P. rapae* und *P. brassicae* war der WT gleich gut als Wirtspflanze geeignet wie die Mutanten. Dass Spezialisten weniger stark auf Veränderungen innerhalb typischer Sekundärmetabolite ihrer Wirtspflanze reagieren, ist allgemein akzeptiert (SCHONHOVEN et al. 1998, RENWICK 2002). Allerdings konnte in vorherigen Studien auch eine negative Wirkung von GS und korrespondierenden Abbauprodukten für *Pieris*-Arten nachgewiesen werden (AGRAWAL & KURASHIGE 2003, MEWIS et al. 2006). Die unterschiedliche Eignung der Mutanten für den Generalisten und den Spezialisten könnte auf eine unterschiedlich starke Induktion der GS durch die Insekten, welche anders als im WT ist,

zurückgeführt werden (Daten nicht dargestellt). Weiterführende Fraßstudien mit weiteren GS-Mutanten und umfangreiche Korrelationen von Insektenbiotestdaten zu GS-Gehalten stehen noch aus.

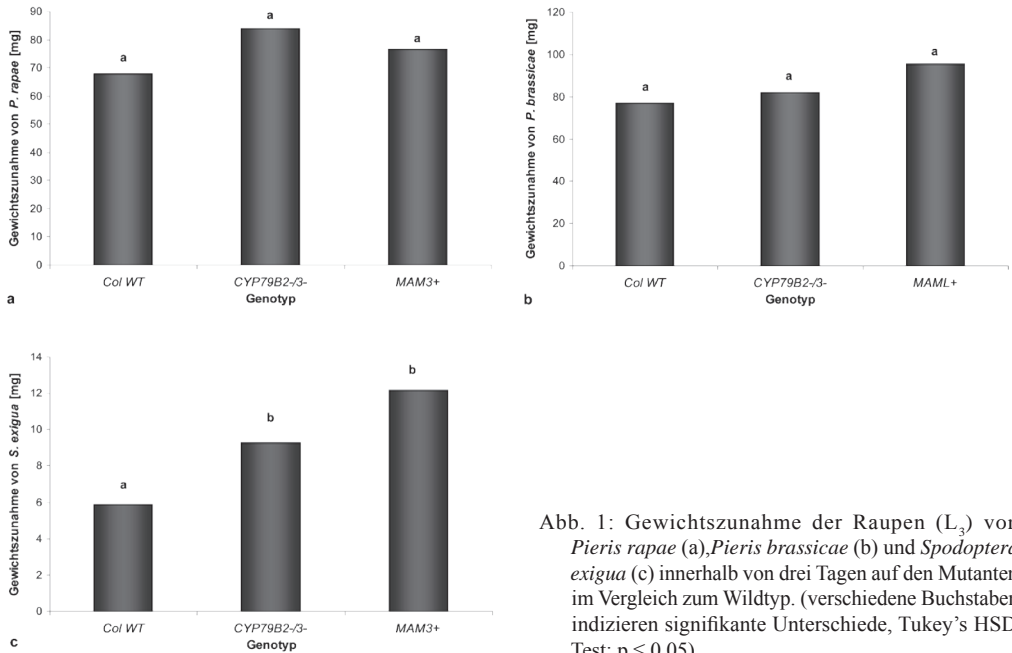


Abb. 1: Gewichtszunahme der Raupen (L₃) von *Pieris rapae* (a), *Pieris brassicae* (b) und *Spodoptera exigua* (c) innerhalb von drei Tagen auf den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. (verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede, Tukey's HSD-Test: $p \leq 0,05$)

Literatur

- AGRAWAL A.A. & KURASHIGE N.S. (2003): A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae* – J. Chem. Ecol. **29** (6): 1403-1415.
- FAHEY, J.W., ZALCMANN, A.T. & TALALAY, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants – Phytochemistry **56**: 5-51.
- HALKIER, B.A. & GERSHENZON, J. (2006): Biology and biochemistry of glucosinolates – Ann. Rev. Plant Biol. **57**: 303-333.
- 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.
- 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.
- MEWIS, I., TOKUHISA, J. G., SCHULTZ, J. C., APPEL, H.M., ULRICHS, CH. & GERSHENZON, J. (2006): Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* signaling mutants in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways – Phytochemistry **67**: 2450-2462.
- RASK, L., ANDRÉASSON, E., EKBOM, B., ERIKSSON, S., PONTOPPIDAN, B. & MEIJER, J. (2000): Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae – Plant Mol. Biol. **42**: 93-113.
- RENWICK, J.A.A. (2002): The chemical world of crucivores: lures, treats and traps – Entomol. Exp. Appl. **104**: 35-42.
- SCHOONHOVEN, L.M., JERMY, T & VAN LOON, J.J.A. (1998): Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution. Chapman & Hall, London.

