



**UvA-DARE (Digital Academic Repository)**

**Unraveling the cold response in Draba**

von Meijenfeldt, N.

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*  
von Meijenfeldt, N. (2010). *Unraveling the cold response in Draba*.

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# S

## Samenvatting

Soorten van het genus *Draba* komen verspreid over de hele wereld voor. Dit biedt ons de mogelijkheid om te onderzoeken hoe soorten uit verschillende leefomgevingen om kunnen gaan met kou en vorst. In dit proefschrift is de reactie op koude van *Draba*-soorten uit tropisch-alpiene gebieden vergeleken met die van Arctisch-alpiene soorten en soorten uit gematigde gebieden. De tropische hooggebergten worden gekenmerkt door een jaarrond groeiseizoen, terwijl groei in Arctische en gematigde regio's seizoensgebonden is. In de tropische hooggebergten komen regelmatig lage temperaturen voor; binnen 24 uur kan een hete dag gevolgd worden door een koude nacht waarbij nachtvorst niet uitzonderlijk is. Arctisch-alpiene regio's hebben lange, koude winters en zelfs gedurende de zomer kan het 's nachts vriezen. Planten die hier groeien moeten beter voorbereid zijn op koude temperaturen dan planten uit gematigde gebieden, waar vorst periodiek in de winter of het vroege voorjaar voorkomt. Onze werkhypothese was dat de kouderespons van gematigde soorten verschilt van die van tropisch- en Arctisch-alpiene soorten.

Lage temperaturen zijn wereldwijd een limiterende factor voor de verspreiding van planten. Vanwege hun vaste standplaats moeten planten zich aan de aanwezige lokale omstandigheden aanpassen om te overleven. Planten hebben een breed scala aan aanpassingen ontwikkeld om zich tegen lage temperaturen te wapenen. Dit kunnen fysieke aanpassingen zijn, zoals een compacte groeivorm, behaard bladoppervlak of kleine, in een rozet gerangschikte bladeren. Ook op fysiologisch niveau kunnen planten zich aanpassen, bijvoorbeeld door extra suikers of metabolieten aan te maken die als antivries fungeren en de cel beschermen tegen vorstschade. Een belangrijk onderdeel van de fysiologische aanpassing van planten is 'koude-acclimatisatie'. Dit is een proces waarbij planten hun vorsttolerantie kunnen verhogen na een initiële blootstelling aan lage temperaturen die nog wel boven het vriespunt zijn.

Bij blootstelling aan kou wordt een kettingreactie in gang gezet die uiteindelijk leidt tot het activeren van het vermogen van planten om zich tegen vorst te wapenen. Er zijn verschillende genen bekend die een cruciale rol spelen in deze zogenaamde kouderespons. De focus van dit proefschrift is daarom tweeledig; enerzijds hebben we de expressie van genen die betrokken zijn bij de *kouderespons* van planten onderzocht in verschillende *Draba*-soorten. Anderzijds hebben we van dezelfde soorten overleving van juveniele planten en de mate van celschade als gevolg van *vorst* onderzocht.

Om de kouderespons van de verschillende *Draba*-soorten te onderzoeken, werd een uniek experiment opgezet waarbij de natuurlijke fluctuatie in licht en temperatuur werd gesimuleerd. Zaailingen werden bij een 21/15°C (dag/nacht) temperatuurritme en een 12-urige fotoperiode opgekweekt. De koudebehandeling daarentegen bestond uit een omschakeling naar een 21/4°C (dag/nacht) temperatuurritme met behoud van de 12-urige fotoperiode. Op deze wijze werden de natuurlijke omstandigheden, zoals die zich in de tropische hooggebergten van Ecuador voordoen, nagebootst. Vergelijkbare omstandigheden komen in het voor- en najaar in de gematigde regio voor en incidenteel in het Arctisch gebied.

Dit proefschrift concentreert zich op de vergelijking van de kouderespons in twee gematigde *Draba*-soorten (*D. verna* en *D. muralis*), één Arctisch-alpiene (*D. nivalis*) en één tropisch-alpiene *Draba*-soort (*D. hookeri*). De modelplant *Arabidopsis thaliana* is als referentie bij alle gecontroleerde experimenten gebruikt.

Uit onderzoek aan de model plant *Arabidopsis thaliana* is gebleken dat *CBF*-genen (coderend voor transcriptiefactoren) een belangrijke rol spelen in de kouderespons. *CBF*-genen worden in reactie op kou geïnduceerd, wat tot de expressie van de *COR*-genen leidt, die op hun beurt een verhoogde koudetolerantie in de plant teweegbrengen. Deze transcriptionele respons wordt als het ‘*CBF*-regulon’ beschreven en is in vele plantensoorten functioneel gebleken. Om te kunnen onderzoeken of en hoe *Draba*-soorten het *CBF* regulon gebruiken in hun kouderespons hebben wij door middel van een PCR-strategie de homologe genen uit *Draba* gekloneerd. In dit proefschrift rapporteren wij de identificatie van drie klassen *CBF*- en twee klassen *COR15*-genen (waarvan één met een afwijkende structuur) in *Draba*. Onze resultaten demonstreren dat een koudebehandeling resulteert in een verhoogde expressie van de onderzochte genen en dat de kinetiek in expressie van *CBF* en *COR15* verschilt tussen *Draba*-soorten. Zo komt het meest voorkomende *CBF<sub>c</sub>*-gen in de twee gematigde soorten sneller tot expressie in reactie op koude dan het *CBF<sub>a</sub>*-gen in de Arctisch- en tropisch-alpiene soorten. Dit verschil in inductie van *CBF*-expressie leidde echter niet tot een verschil in het moment waarop de *COR15* homologe genen in de verschillende soorten tot expressie kwamen. Kortom, de volgorde van inductie was altijd gelijk, maar de tijd tussen de expressie van *CBF* en *COR15* varieerde. Opvallend was dat het expressieniveau van *CBF* en *COR15* in *Draba* 10-20x lager bleek te zijn dan in *Arabidopsis*. Hierdoor concluderen wij dat de in *Draba* geïdentificeerde *CBF*- en *COR15*-genen niet dezelfde functie vervullen als in *Arabidopsis*. Aanvullend onderzoek aan de hand van bijvoorbeeld overexpressie of ‘knockout-lijnen’ (transgene planten) is nodig om meer inzicht te krijgen in de functionele rol van het *CBF*-regulon in *Draba*.

Om te onderzoeken of de gevonden verschillen op genexpressieniveau ook verschillen op metabolietniveau tot gevolg hebben, is vervolgens het proline- en suikergehalte van de planten geanalyseerd (door dr. E. Zuther van het MPI Golm). Het prolinegehalte, dat een duidelijke toename in reactie op kou liet zien in *Arabidopsis*, veranderde niet in *Draba* na de koudebehandeling. De soort uit de gematigde zone, *D. muralis* had een constitutief hoog prolinegehalte, wat mogelijkheden tot aanvullend onderzoek biedt. Een andere suiker, raffinose, welke geacht wordt belangrijk te zijn in de koudetolerantie van *Arabidopsis*, nam na de koudebehandeling in twee van de drie onderzochte *Draba*-soorten toe. Er bleek geen sprake te zijn van een eenduidige relatie tussen inductie van de genexpressie en de toename van proline en suikers in *Draba*.

Na de moleculaire aspecten van de kouderespons onderzocht te hebben, richtten we ons vervolgens op de vorsttolerantie van *Draba*-soorten. Hiervoor werd de overleving van juveniele planten (zaailingen) bepaald bij temperaturen van  $-5$  tot  $-15^{\circ}\text{C}$ . Daarnaast hebben we onderzocht hoeveel weefselschade er optreedt bij vorst. In beide experimenten werd onderzocht of *Draba*-soorten in staat zijn door koude-acclimatisering hogere vorsttolerantie te verkrijgen. Wanneer alle soorten onder gelijke omstandigheden werden opgekweekt voordat ze aan vorst werden blootgesteld, bleek dat sommige soorten vorsttoleranter zijn dan anderen. *Arabidopsis*-ecotype Col-wt bleek het meest vorsttolerant van alle onderzochte soorten. Van de *Draba*-soorten tolereerden de twee soorten uit de gematigde zone de laagste temperaturen, terwijl de tropisch-alpiene *D. hookeri* het meest vorstgevoelig was.

Koude-acclimatisering leidde in alle soorten, met uitzondering van *D. hookeri*, tot een toename in vorsttolerantie. De gevonden verschillen in de vorsttolerantie van geacclimatiseerde tropisch-alpiene, Arctisch-alpiene en gematigde *Draba*-soorten suggereert genetische adaptatie aan de temperaturomstandigheden in hun natuurlijke habitat.

Tropisch-alpiene *D. hookeri* blijkt de meest vorstgevoelige *Draba* te zijn, die ook het vermogen mist om door middel van koude-acclimatisatie zijn vorsttolerantie te verhogen. In een omgeving waar temperatuursschommelingen binnen een etmaal groot zijn, verwachten wij dat een geleidelijke methode voor het verhogen van de vorsttolerantie voor planten geen nut heeft. Dit in tegenstelling tot soorten die in Arctisch-alpiene of gematigde gebieden voorkomen en die door het wisselen van seizoenen hun vorsttolerantie langzaam kunnen opbouwen. Hierdoor is het mogelijk dat een afname in selectiedruk heeft geleid tot verlies van het vermogen tot acclimatisatie aan koude omstandigheden in *D. hookeri*. Desondanks overleeft deze soort goed in zijn natuurlijke omgeving. Dit impliceert dat deze omgeving mogelijk minder extreem is dan die van een ander klimaat of dat van andere *Draba*-soorten.

Om te onderzoeken of de kouderespons onder natuurlijke omstandigheden wordt geïnduceerd, is in dit proefschrift ook de *CBF*-expressie van vijf tropisch-alpiene *Draba* soorten in de natuurlijke habitat in Ecuador bestudeerd. Ondanks de aanwezige variatie in klimatologische omstandigheden tussen de onderzoeksgebieden bleek dat de *CBF*-genen in alle onderzochte soorten geïnduceerd werden. Een vergelijking tussen de expressieniveaus onder gecontroleerde en veld omstandigheden toont aan dat volwassen planten in het veld een hoger niveau (>10x) van *CBF*-expressie hebben dan juveniele planten in het laboratorium. Daarbij blijkt dat de expressiepatronen zoals gevonden in het laboratorium vaak niet overeenkomen met die uit het veld. In tegenstelling tot de laboratoriumresultaten demonstreren de veldresultaten ook een *CBF*-inductie bij zonsopkomst. Dit suggereert een mogelijke rol voor *CBF* aan het begin van de dag wanneer de temperatuur nog laag is en het proces van fotosynthese begint. Verschillen tussen laboratorium- en veldexperimenten benadrukken de noodzaak van meer veldexperimenten, ondanks de uitdagingen die men in het veld aantreft – zeker op 3900 m boven zeeniveau – en de hoeveelheid factoren waar men geen controle over heeft.

Hoewel *Draba* nog geen genetisch modelsysteem is zoals *Arabidopsis*, is het een interessant genus om te onderzoeken. Met name de variatie op morfologisch, genetisch en fysiologisch vlak is enorm. Verder biedt het genus *Draba* de mogelijkheid om soorten uit verschillende geografische regio's met elkaar te vergelijken, evenals planten met verschillende groeivormen, éénjarige en meerjarige planten en tenslotte diploïde en polyploïde soorten. Vanwege het gevonden verschil in vorsttolerantie met *Arabidopsis* zou *Draba* nieuwe informatie kunnen leveren met betrekking tot genen en of transductieroutes die nog niet in andere (model)taxa zijn aangetroffen.