



From Induction to Suppression: How to Manipulate Plant Defenses

B.C.J. Schimmel

SAMENVATTING

In **Hoofdstuk 1** beschrijf ik in hoofdlijnen onze huidige kennis over de interactie tussen planten en plantenetende organismen zoals pathogenen, insecten en mijten. Planten en hun belagers zijn in hechte associatie gedurende honderden miljoenen jaren geëvolueerd. Deze evolutie is in grote mate bepaald door het antagonistische karakter van hun interacties: waar planten beschikken over talloze (defensieve) eigenschappen die primair tot doel hebben om te voorkomen dat andere organismen ze opeten (resistentie), beschikken de belagers op hun beurt over eigenschappen die hen in staat stellen om de plantenverdediging te weerstaan of te omzeilen, zodat ze zich kunnen voeden met de plant. Deze interacties kunnen hebben geresulteerd in co-evolutie van specifieke defensieve eigenschappen van planten en offensieve- dan wel defensieve contra-eigenschappen van plantenetende organismen.

Een typische adaptatie van pathogenen -en vooral herbivoren- aan gifstoffen die door planten worden geproduceerd (een veelvoorkomend type van verdediging) is detoxificatie. Een andere adaptatie is het vermogen om de moleculaire mechanismes die plant-afweerreacties reguleren te manipuleren, zodat de voor belagers schadelijke responsen niet (correct) worden uitgevoerd en daardoor niet resulteren in (volledige) resistentie. Een dergelijke moleculaire sabotage onderdrukt dus de verdedigingsrespons van de waardplant. In de wetenschappelijke literatuur zijn een behoorlijk aantal voorbeelden te vinden van pathogenen (zoals bacteriën en schimmels) die de verdediging van hun waardplant onderdrukken. Echter, onze kennis over de onderdrukking van de plantenverdediging door plantenetende geleedpotigen (zoals insecten en mijten) is zeer beperkt. Onderzoek naar hoe, en in welke mate, herbivoren hun waardplant manipuleren kan ons beter doen begrijpen welke selectieve krachten bepalend zijn voor plant-herbivoor interacties. Kennis opgedaan met dit soort onderzoek is bovendien erg waardevol voor de land- en tuinbouwsector, omdat het ons kan helpen gewasresistenties te verhogen en daardoor oogstverlies als gevolg van plagen te verminderen.

Het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift had tot doel om meer inzicht te verkrijgen in de interactie tussen verdediging-onderdrukkende spintmijten en tomatenplanten. Om precies te zijn, ik heb onderzocht hoe (op moleculair niveau) de gecultiveerde tomatenplant (*Solanum lycopersicum*) reageert op de aanwezigheid van de destructieve plaagsoorten *Tetranychus urticae* en *Tetranychus evansi*, met als doel om de verdediging van tomatenplanten tegen deze spintmijten te herstellen middels genetische modificaties.

Net zoals mensen maken planten gebruik van verschillende hormonen om hun groei, ontwikkeling, reproductie en verdedigingsresponsen te reguleren. Met betrekking tot het laatstgenoemde zijn de twee hormonen salicylzuur (SA) en jasmonzuur (JA) cruciaal voor de plant om schade door pathogenen en herbivoren te voorkomen of te beperken, om zodoende een maximale reproductie (zaadproductie) te waarborgen onder uiteenlopende ecofysiologische omstandigheden. Verdedigingsresponsen tegen pathogenen die levend plantenweefsel eten en tegen geleedpotige herbivoren die niet of nauwelijks bewegen (zoals vleugelloze bladluizen en witte vlieg- en trips-larven) worden over het algemeen gereguleerd door SA, terwijl verdedigingsresponsen tegen pathogenen die dood plantenweefsel eten en tegen beweeglijke geleedpotigen (zoals rupsen, mijten en kevers) worden gereguleerd door JA. Beide hormonen reguleren de transcriptie van genen die verantwoordelijk zijn voor de afweerreacties van de plant door onder andere de productie van gifstoffen en defensieve eiwitten te starten of te verhogen.

Voor **Hoofdstuk 2** hebben we spintmijtopopulaties (*T. urticae* en *T. evansi*) in hun natuurlijke omgeving bemonsterd en de verzamelde mijten vervolgens opgekweekt in het laboratorium. Voor *T. urticae* hebben we de genetische variatie van honderden mijten (verzameld van drie verschillende waardplanten) gefixeerd in de vorm van "lijnen" verkregen door middel van moeder-zoon kruisingen. Met mijten van deze genetisch relatief homogene lijnen hebben we experimenten uitgevoerd om te bepalen in welke mate ze; (1) dezelfde verdedigingsresponsen induceren wanneer ze van tomatenplanten eten, en (2) hinder ondervinden van JA-gereguleerde afweerreacties (hoe

beïnvloedt dit hun eiproductie?). In Hoofdstuk 2 beschrijf ik dat, wat betreft deze eigenschappen, de geteste mijtenlijnen erg van elkaar verschillen. Ten eerste namen we waar dat de meeste lijnen weliswaar de JA verdediging induceerden, maar er ook enkele lijnen waren die deze respons onderdrukten. Er is dus intraspecifieke variatie voor de verdediging-onderdrukkende eigenschap en de frequentie waarin we dit aantreffen suggereert dat deze eigenschap niet heel erg zeldzaam is in natuurlijke *T. urticae* populaties. Ten tweede, hoewel de meeste lijnen hinder ondervonden van de JA verdediging, vonden we ook lijnen die resistent waren. Daarbij moet worden opgetekend dat deze eigenschap veel zeldzamer was dan de verdediging-onderdrukkende eigenschap. Door experimenten met mijten van een Braziliaans en een Spaans *T. evansi* haplotype hebben we bovendien bevestigd dat deze zustersoort van *T. urticae* in staat is om de verdedigingsresponsen van tomatenplanten zeer sterk te onderdrukken. Mogelijk is de verdediging-onderdrukkende eigenschap volledig gefixeerd in *T. evansi*.

Voorts hebben we in het laboratorium gedetailleerd onderzoek gedaan naar de temporele dynamiek van zowel de inductie als onderdrukking van de afweerreacties van tomatenplanten door de concentraties van JA en SA, alsmede de expressieniveaus van verschillende verdedigingsgerelateerde genen, te meten in bladeren vanaf de introductie van de mijten tot kort voor de totale destructie (dood) van het blad. Voor deze experimenten hebben we gebruik gemaakt van de twee eerder genoemde *T. evansi* haplotypes, van *T. urticae* Santpoort-2 (een verdediging-inducerende lijn) en van *T. urticae* DeLier-1 (een verdediging-onderdrukkende lijn). De resultaten tonen aan dat, hoewel de orde van grootte verschilde, mijten van beide soorten afweerreacties onderdrukten en wel op een punt in de signaaltransductieroute dat zich na de initiële accumulatie van JA en SA bevindt. De resultaten laten ook zien dat deze onderdrukking onafhankelijk is van een welbekend antagonistisch signaleringsmechanisme tussen JA en SA. Bovendien hebben we aangetoond dat de onderdrukking van de verdediging door *T. evansi* sterk genoeg is om de JA en SA responsen, die normaliter door *T. urticae* Santpoort-2 geïnduceerd worden, te onderdrukken wanneer beide mijtensoorten tegelijk van een blad eten. Als gevolg hiervan produceerden de *T. urticae* Santpoort-2 mijten op dergelijke gedeelde bladeren tot wel 45 procent meer eieren. Uit een vergelijkbaar experiment met *T. urticae* DeLier-1 en *T. urticae* Santpoort-2 op hetzelfde blad is gebleken dat eerstgenoemde een minder sterke onderdrukker van de tomatenverdediging is dan *T. evansi*, aangezien DeLier-1 er alleen in slaagde de door Santpoort-2 geïnduceerde SA responsen te onderdrukken en de eiproductie van Santpoort-2 vrouwtjes met "slechts" 25 procent toenam.

In **Hoofdstuk 3** hebben we nader onderzoek gedaan naar de bevinding dat verdediging-onderdrukkende mijten een positief effect hebben op de eiproductie van verdediging-inducerende mijten wanneer deze een blad delen. We hebben ons hierbij ook gericht op mogelijk wederkerende effecten van verdediging-inducerende mijten op verdediging-onderdrukkende mijten. Voor dit onderzoek hebben we eerst, zonder de plant te beschadigen, tomatenbladeren in drie even grote sectoren verdeeld (bladbasis, -midden en -punt) door dunne barrières van lanoline (wolvet) aan te brengen. Daarna hebben we onderdrukkende (*T. evansi*) of inducerende (*T. urticae* Santpoort-2) mijten geïntroduceerd op de midden-sector en/of de bladpunt-sector. Op verschillende tijdstippen na de introductie van de mijten hebben we hormoonconcentraties en genexpressie-niveaus bepaald in ieder van de bladsectoren om zo meer inzicht te verkrijgen in hoe verdedigingsresponsen zich precies voltrekken.

In tegenstelling tot onze verwachting vonden we dat inductie van afweerreacties door spintmijten voornamelijk lokaal was, dat wil zeggen dat de inductie grotendeels beperkt bleef tot de bladsector waar de mijten aten. Net zoals in Hoofdstuk 2 beschreven is, was de onderdrukking van de verdediging vooral zichtbaar als non-inductie (niet verschillend van de controleplanten) of als gereduceerde inductie (meer dan in de controleplanten, maar minder dan in de planten met *T. urticae* Santpoort-2) in plaats van onderdrukking tot beneden het niveau van controleplanten. Echter, waar we in Hoofdstuk 2 waarnamen dat het delen van een blad gedurende een periode van vier dagen een positief effect had op de eiproductie van *T. urticae* Santpoort-2, bleek in Hoofdstuk 3 een deel-periode van twee dagen niet voldoende om eenzelfde effect teweeg te brengen. Op grond

van de vele verschillen in de opzet van de experimenten die zijn uitgevoerd in Hoofdstukken 2 en 3 concluderen we dat verdediging-inducerende *T. urticae* mijten daadwerkelijk profijt kunnen hebben van de aanwezigheid van verdediging-onderdrukkende mijten, maar dat dit niet altijd of onmiddellijk het geval is en waarschijnlijk afhankelijk is van: het aantal inducerende versus onderdrukkende mijten (of hun ratio), de volgorde van aankomst, de tijd die ze samen doorbrengen, en mogelijk hun posities (ten opzichte van elkaar) op het blad of de plant.

Naast dit alles zijn we ook nog op een intrigerend fenomeen gestuit: wanneer inducerende *T. urticae* mijten op een bladsectie werden geïntroduceerd naast een sectie met *T. evansi*, onderdrukten deze *T. evansi* mijten de afweerreacties nog sterker. Dit fenomeen ("hyperonderdrukking") viel samen met; (1) de toegenomen expressie van *T. evansi* effector-genen, welke coderen voor speekselwitten die tijdens het eten de plant in worden geïnjecteerd en die de verdediging onderdrukken, en (2) met een hogere eiproductie van de *T. evansi* mijten. Deze overcompensatierespons van *T. evansi* suggereert dat de mijt met het verhogen van de eiproductie direct reageert op de nabijheid van concurrenten om zo mogelijk de competitieve populatiegroei te versterken. Hoewel het me niets zal verbazen als deze overcompensatierespons kosten met zich mee brengt, dat wil zeggen dat het ten koste van andere activiteiten of eigenschappen gaat, hebben we hier geen aanwijzingen voor gevonden. Ook het signaal(molecuul) dat de overcompensatierespons veroorzaakt is nog onbekend. Wat op basis van de overcompensatierespons wel duidelijk is, is dat de eiproductie van mijten een eigenschap is die wellicht plastischer is dan voorheen aangenomen.

In **Hoofdstuk 4** hebben we in kaart gebracht welke bacteriën zich op en/of in *T. urticae* DeLier-1 en *T. urticae* Santpoort-2 bevinden en hebben we onderzocht of de aan- of afwezigheid van bepaalde bacteriën samenhangt met de inductie dan wel onderdrukking van de plantenverdediging. Volgens onze analyses herbergen deze twee mijtenlijnen verschillende bacteriële endosymbionten (bacteriën die in de cellen van hun gastheer leven): DeLier-1 mijten bevatten *Wolbachia*, terwijl Santpoort-2 mijten *Cardinium* bevatten. Daarnaast vonden we *Spiroplasma* in mijten van beide lijnen. Om vervolgens te bepalen wat de invloed van deze endosymbionten is op de fitness van de mijten, op de expressie van mijten-genen, en op de inductie/onderdrukking van afweerreacties van tomatenplanten, hebben we de mijten behandeld met antibiotica om deze bacteriën te verwijderen. Voor DeLier-1 resulteerde de antibioticabehandelingen in lijnen zonder *Wolbachia* en *Spiroplasma* (W-S-) en lijnen zonder *Wolbachia* maar die nog wel *Spiroplasma* bevatten (W-S+). Voor Santpoort-2 resulteerde de antibioticabehandelingen alleen in lijnen zonder *Cardinium* en *Spiroplasma* (C-S-).

Wat betreft de verdediging-onderdrukkende lijn DeLier-1 resulteerde het verwijderen van *Wolbachia* in een reductie van de overlevingskans van deze mijten en ook de expressie van genen die betrokken zijn bij de voedselvertering en detoxificatie. Tomatenbladeren aangevreten door niet behandelde DeLier-1 mijten -die dus zowel *Wolbachia* als *Spiroplasma* bevatten (W+S+)- hadden een hogere OPDA concentratie (OPDA is een metabole precursor van JA) en een lagere SA concentratie dan bladeren aangevreten door mijten die alleen *Spiroplasma* bevatten. In bladeren aangevreten door mijten zonder endosymbionten vonden we tussenliggende OPDA en SA concentraties. De JA concentraties vertoonden geen consistente verschillen tussen de verschillende behandelingen. Het vergelijken van de hormoon- en genexpressiedata leverde een verwarrend totaalplaatje op, omdat een gedeelte van de data niet goed te rijmen was met eerder gepubliceerde data. Het expressieniveau van één gen dat geassocieerd is met de SA verdediging volgde daadwerkelijk het patroon van de SA concentraties, maar dat van een tweede SA-indicator gen deed dat niet. We vonden iets vergelijkbaars voor de expressieniveaus van genen die geassocieerd zijn met de JA verdediging: één JA-indicator gen kwam het hoogst tot expressie in bladeren aangevreten door mijten zonder endosymbionten, terwijl de expressieniveaus van twee andere JA-indicatoren geen verschillen lieten zien tussen de behandelingen. Nog verwarrender was dat de expressiepatronen van vijf vermoedelijk door OPDA geregeerde genen tegengesteld waren aan de OPDA concentraties. Uiteindelijk is de belangrijkste conclusie dat de onderdrukking van de plantenverdediging door DeLier-1 niet toeschrijven kan worden aan de aan- of afwezigheid van (bepaalde) bacteriële endosymbionten.

Wat betreft de verdediging-inducerende lijn Santpoort-2 namen we waar dat de niet behandelde mijten -die dus zowel *Cardinium* als *Spiroplasma* bevatten (C+S+)- een lagere overlevingskans, een lagere eiproductie, en een lagere vreet-intensiteit hadden dan mijten zonder deze bacteriën. Opmerkelijk genoeg resulteerde vraat door mijten met *Cardinium* en *Spiroplasma* in roestachtige, rood-bruin gekleurde vraatschade op het blad, terwijl vraat door mijten zonder deze endosymbionten wit gekleurde vraatschade opleverde. Er zijn ook *T. kanzawai* lijnen bekend die ofwel rood-bruine of witte vraatplekken achterlaten. In het geval van *T. kanzawai* is het ontstaan van de rood-bruine vraatplekken het gevolg van de expressie van een enkel, dominant mijten-gen. Wij vermoeden dan ook dat er een direct verband is tussen eenzelfde gen in *T. urticae* Santpoort-2 en de aanwezigheid van *Cardinium* en/of *Spiroplasma* bij de formatie van rood-bruine vraatplekken. Er waren geen significante verschillen in de OPDA, JA of SA concentraties van bladeren aangevreten door mijten die wel of geen *Cardinium* en *Spiroplasma* bevatten. Echter, de concentratie van abscisinezuur (ABA), een hormoon dat vooral betrokken is bij de regulatie van abiotische stress-responsen, was hoger in bladeren aangevreten door mijten zonder *Cardinium* en *Spiroplasma* dan in bladeren met mijten die deze bacteriën wel bevatten. Bovendien waren de expressieniveaus van twee SA-indicator genen omgekeerd gecorreleerd met ABA concentraties; expressie van deze genen was het hoogst in bladeren aangevreten door Santpoort-2 mijten mét *Cardinium* en *Spiroplasma*. De verkregen data suggereert dat *Cardinium* en *Spiroplasma* bijdragen aan de inductie van SA-responsen door Santpoort-2 mijten.

Op basis van de data in Hoofdstuk 4 concluderen we dat bacteriële endosymbionten invloed kunnen hebben op de fitness van mijten, op de expressie van verschillende mijten-genen, en mogelijk ook op de door SA gereguleerde plantverdedigingsresponsen die geïnduceerd worden door vraat van mijten. Over het geheel genomen, lijkt *Wolbachia* een symbiont die voordelen oplevert voor de mijt (positief effect op mijtenfitness), terwijl de combinatie van *Cardinium* en *Spiroplasma* parasitair overkomt (negatief effect op mijtenfitness). Aangezien de effecten van *Wolbachia* gedeeltelijk teniet werden gedaan door *Spiroplasma* is een interactie tussen deze bacteriën aannemelijk, maar het blijft onduidelijk waarom ze interacteren en ook wat het precieze effect van *Spiroplasma* op de gastheer (mijt) is.

In **Hoofdstuk 5** heb ik eerst in tomatenplanten gezocht naar promotoren in het DNA die genexpressie activeren in reactie op vraat door *T. evansi* mijten, om deze promotoren vervolgens te gebruiken bij het creëren van transgene tomatenplanten met promotor::verdedigingsgen fusieconstructen die de onderdrukking van plantafweerreacties verijdelen. Om tomatengen te vinden die worden geïnduceerd door *T. evansi* heb ik de transcriptomen van tomatenplanten die aangevreten waren door verdediging-onderdrukkende dan wel verdediging-inducerende mijten met elkaar en met (schone) controleplanten vergeleken middels microarrays en transcriptome-sequencing (RNA-seq). Vraat door *T. urticae*, hetzij DeLier-1 of Santpoort-2, resulteerde in de grootste aantallen van geïnduceerde- en onderdrukte tomatengen, waarbij Santpoort-2 driemaal zoveel genen induceerde als DeLier-1. Het transcriptoom van door *T. evansi* aangevreten planten daarentegen, leek het meest op dat van controleplanten, aangezien *T. evansi* grofweg zesmaal minder genen induceerde dan Santpoort-2. Slechts een klein aantal van deze genen reageerde specifiek op *T. evansi*. De identiteit van deze *T. evansi*-specifieke genen verschaftte geen aanwijzingen over hoe (mechanistisch gezien) de plantenverdediging onderdrukt wordt.

Uit de kleine groep door *T. evansi* geïnduceerde genen heb ik die genen geselecteerd die het snelst en meest geïnduceerd worden door (verdediging-onderdrukkende) mijten, maar die niet of nauwelijks tot expressie komen in controleplanten. Vervolgens heb ik de promotor regio (het regulatoire DNA fragment dat vooraf gaat aan het eiwit-coderende gedeelte) van enkele van deze genen geïsoleerd, gekloneerd en daarna gefuseerd met; (a) de eiwit-coderende regio van Prosystemin (uit tomaat) om zodoende een mijt-induceerbare JA verdediging te construeren, of met; (b) de eiwit-coderende regio van Avr4 (uit een pathogene schimmel) om een mijt-induceerbare anti-pathogeen verdediging te genereren (een verdedigingsrespons die gekarakteriseerd wordt door lokale celdood en de productie van defensieve eiwitten). Uiteindelijk heb ik tomatenplanten

genetisch getransformeerd met telkens één van de gegenereerde constructen met als doel om de verdediging tegen onderdrukkende mijten te herstellen. De resultaten van tot dusver gedane experimenten met getransformeerde planten suggereren dat sommige promotor::verdedigingsgen constructen goed reageren op mijtenvraat en dus mogelijk gebruikt kunnen worden om de verdediging van tomatenplanten weer te laten functioneren.

In **Hoofdstuk 6** tenslotte, bediscussieer ik de hoogtepunten van mijn bevindingen en laat ik data zien van preliminaire experimenten aangaande veranderingen in het primaire metabolisme van de plant (suikerconcentraties en fotosynthese) in reactie op vraat door verdediging-inducerende en verdediging-onderdrukkende mijten, om zo de volgende vragen te beantwoorden: (V1) kunnen we vaststellen op welk punt van de verdedigings-sigtaaltransductieroute de onderdrukking door de mijt actief is? (V2) Wat is de bron van de onderdrukking? (V3) In welke mate kunnen inducerende mijten profiteren van onderdrukkende mijten? (V4) Is “promotor-vervanging” een geschikte strategie om resistentie te genereren?

Aangaande V1 concludeer ik dat de onderdrukking optreedt na de productie van JA en SA en onafhankelijk is van antagonistische JA-SA interacties. De onderdrukking heeft effect op zowel het primaire- als secundaire metabolisme van de plant en wellicht op de herverdeling van voedingsstoffen en defensieve metabolieten. Wat betreft V2 concludeer ik dat speekselmoleculen (effectoren) de primaire bron van de onderdrukking zijn. Mogelijk manipuleren effectoren algemene regulatoire plantsystemen zoals het eiwitcomplex dat andere moleculen afbreekt (proteasome). Micro-organismen die zich op of in de mijt bevinden, kunnen plant-afweerreacties als gevolg van mijtenvraat ook beïnvloeden, maar misschien eerder door zulke responsen te induceren dan door ze te onderdrukken. Wat betreft V3 concludeer ik dat inducerende mijten profijt kunnen hebben van de onderdrukking van verdedigingsresponsen omdat het de kwaliteit van hun voedsel verbetert, maar dit zal niet altijd (onder alle omstandigheden) het geval zijn. Onderdrukkende mijten kunnen op hun beurt reageren op de aanwezigheid van inducerende mijten middels hyper-onderdrukking en overcompensatie van hun eiproductie. Tot slot, aangaande V4 concludeer ik dat promotoren die genexpressie activeren in reactie op vraat door *T. evansi* gebruikt kunnen worden om planten te genereren die afweerreacties activeren in reactie op vraat door inducerende én onderdrukkende mijten.