

Geïnduceerde resistentie tegen pathogenen en insecten in *Arabidopsis*: transcriptomics en specificiteit van de afweer

Vivian van Oosten

Op 18 april 2007 promoveerde Vivian van Oosten aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Induced pathogen and insect resistance in *Arabidopsis*: transcriptomics and specificity of defense'. Promotoren waren Prof. Dr. Marcel Dicke van de leerstoelgroep Entomologie van Wageningen Universiteit, Prof. Dr. Ir. Corné Pieterse van de leerstoelgroep Plant-Microbe Interacties van Universiteit Utrecht en Prof. Dr. Ir. L.C. van Loon van de leerstoelgroep Fytopathologie van Universiteit Utrecht.

Inleiding

Planten kunnen worden aangevallen door zeer diverse ziekteverwekkers en insecten. Om zich te verdedigen, hebben zij uiteenlopende strategieën ontwikkeld. Resistentie tegen pathogenen en insecten kan worden bewerkstelligd door verdedingsmechanismen die altijd aanwezig zijn (constitutief), of door mechanismen die pas actief worden na een aanval (geïnduceerd). Het promotie-onderzoek was gericht op geïnduceerde resistentie in de modelplant zandraket (*Arabidopsis thaliana*), na aanval door zowel pathogenen als insecten.

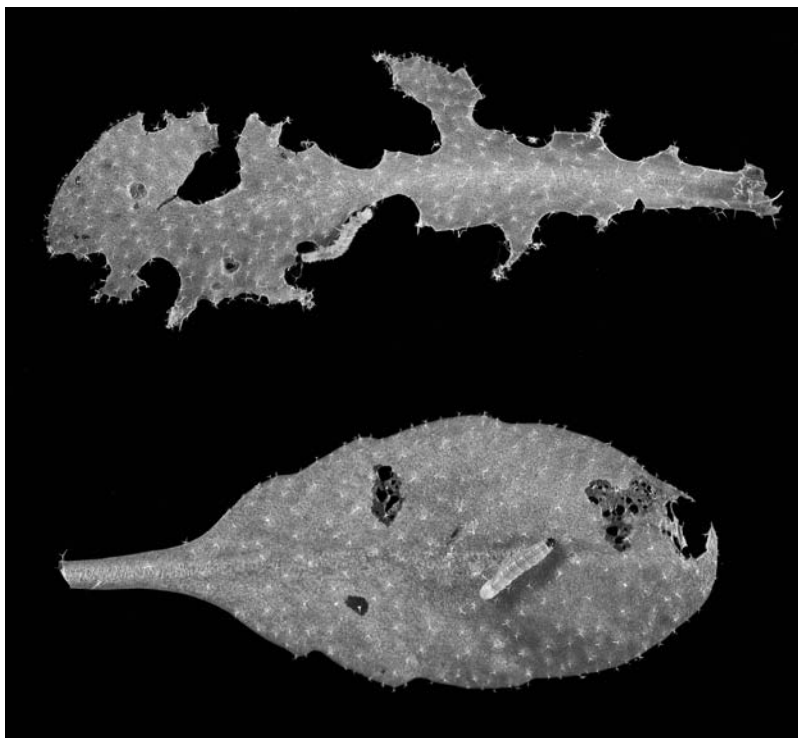
'Cross-effectiveness' tussen door pathogenen en insecten geïnduceerde resistentie

De basis voor het proefschrift was het onderzoek dat samen met Martin de Vos werd uitgevoerd aan de geïnduceerde afweer van *Arabidopsis* tegen de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, de schimmel *Alternaria brassicicola*, en de volgende insecten: rupsen van het kleine koolwitje (*Pieris rapae*), larven van de Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) of groene perzikluizen (*Myzus persicae*) (De Vos, 2006). De opgedane kennis over de productie van plantenhormonen en de daaruit resulterende gen-expressie profielen, leidde tot de vraag wat het spectrum van effectiviteit van de verschillende soorten geïnduceerde afweer zou zijn. Is de afweer tegen pathogenen alleen effectief tegen de aanvaller zelf, of ook tegen insecten? Leidt de reactie op beschadiging door insecten slechts tot afweer tegen de specifieke belager, of is de plant nu ook beter beschermd tegen pathogenen?

Er is al veel bekend over de rol van de plantenhormonen salicylzuur (SA), jasmonzuur (JA) en ethyleen (ET) in de afweer van planten. Het

toedienen van JA aan een plant kan bijvoorbeeld leiden tot verhoogde afweer tegen sommige insecten of necrotrofe pathogenen vergeleken met onbehandelde planten. Omgekeerd zijn planten die geen JA kunnen maken minder goed beschermd tegen deze belagers. Het toedienen van SA kan juist verhoogde resistentie tegen biotrofe pathogenen tot gevolg hebben, terwijl planten die dit signaalmolecuul niet kunnen maken verminderd resistent zijn ten opzichte van onbehandelde of wildtype planten. Verder is aangetoond dat SA de door JA geïnduceerde afweerrespons kan onderdrukken; een bekend voorbeeld van 'cross-talk'. Als planten met SA behandeld zijn, kunnen zij zich minder goed verweren tegen insecten die gevoelig zijn voor een JA-afhankelijk afweermechanisme. De verwachting was dan ook dat resistentie, geïnduceerd door belagers die hoofdzakelijk JA-afhankelijke afweermechanismen stimuleren, tevens effectief zou zijn tegen andere belagers die gevoelig zijn voor JA-afhankelijke afweer. Omgekeerd was de verwachting dat deze vorm van resistentie juist niet effectief zou zijn tegen belagers die gevoelig zijn voor SA-afhankelijke afweermechanismen.

PROMOTIES



Figuur 1. Bladschade aan *Arabidopsis* van rupsen van (boven) klein koolwitje (*Pieris rapae*) en (onder) floridamot (*Spodoptera exigua*).

Effectiviteit van microbieel geïnduceerde resistentie tegen insecten

Het onderzoek was gericht op microbieel geïnduceerde resistentie en de effectiviteit daarvan tegen insecten. In het bijzonder werden twee goed gekarakteriseerde vormen van microbieel geïnduceerde resistentie bestudeerd: 'systemic acquired resistance' (SAR), die geïnduceerd wordt door infectie met een necrotiserend pathogeen, en 'induced systemic resistance' (ISR), die geïnduceerd wordt na kolonisatie van de wortels door niet-pathogene bacteriën. Beide typen geïnduceerde resistentie zijn systemisch van aard en werkzaam tegen een breed, maar slechts ten dele overlapend spectrum van pathogenen. Pathogenen die gevoelig zijn voor SAR, zijn gevoelig voor SA-afhankelijke afweer. Daarentegen zijn pathogenen waartegen ISR werkzaam is, meestal gevoelig voor JA- en ET-afhankelijke afweer. In deze

studie werd de werkzaamheid van door de avirulente bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* geïnduceerde SAR bestudeerd en door de *Pseudomonas fluorescens*-stam WCS417r geïnduceerde ISR tegen de rupsen van het klein koolwitje (*P. rapae*) en de floridamot (*Spodoptera exigua*) (Figuur 1). De rupsen van het kleine koolwitje zijn gespecialiseerd in het eten van kruisbloemigen, een plantenfamilie waartoe ook de zandraket behoort. De floridamot eet juist veel verschillende plantensoorten, en wordt daarom een generalist genoemd. Beide soorten zijn gevoelig voor JA-afhankelijke afweermechanismen, al is de floridamot gevoeliger dan het kleine koolwitje. De verwachting was daarom dat ISR wel en SAR niet werkzaam zou zijn tegen deze rupsen. Bovendien was de veronderstelling dat mogelijke verschillen groter zouden zijn voor de floridamot dan voor het kleine koolwitje. Resistentie tegen insecten treedt op op twee niveaus: directe verdediging, gericht tegen het

aanvallende insect, zoals de productie van toxines, en indirecte verdediging, gericht op het aantrekken van vijanden van het aanvallende insect ('de vijand van mijn vijand is mijn vriend'). Dit laatste komt tot stand doordat de plant na vraat geurstoffen maakt die sluipwespen lokken. De sluipwespen leggen een eitje in de rups (parasitoïde), of ze doden de rups (rover). In dit onderzoek werd de invloed van SAR en ISR op zowel directe als indirecte verdediging tegen de rupsen van de twee plantenetende insectensoorten bestudeerd.

Directe verdediging

Wanneer net uitgekomen rupsen van het kleine koolwitje mochten eten van niet-geïnduceerde planten of planten die SAR of ISR tot expressie brachten, werd waargenomen dat de rupsen zich identiek ontwikkelden op planten van alle drie de behandelingen. Op verschillende tijdstippen waren de rupsen even zwaar (Figuur 2A), en ook de ontwikkeling tot pop verliep even snel (Figuur 2B). Echter, de rupsen van de floridamot bleven achter in groei op planten die SAR of ISR tot expressie brachten in vergelijking tot onbehandelde planten (Figuur 2A). Ook verpopten de rupsen zich later op de planten met een ISR-behandeling (Figuur 2B).

Indirecte verdediging

In een windtunnel werd het effect bekeken van SAR en ISR op het gedrag van de sluipwesp *Cotesia rubecula*. Het induce-

ren van SAR of ISR had geen effect op het gedrag van de sluipwespen. Na vraat door rupsen van het kleine koolwitje of de floridamol waren zowel SAR- of ISR-geïnduceerde als niet-geïnduceerde planten aantrekkelijker voor de sluipwespen dan planten zonder vraat (Figuur 3). Echter, de sluipwespen maakten geen onderscheid tussen SAR-, ISR- en niet-geïnduceerde planten. Het lijkt er dus op dat SAR en ISR geen effect hebben op de indirecte afweerrespons van *Arabidopsis* tegen deze twee soorten insecten.

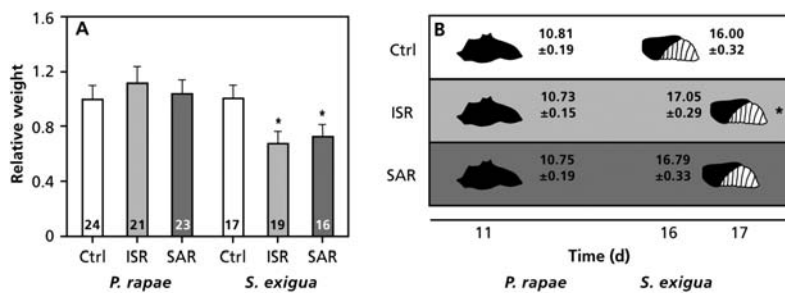
Conclusie

Het proefschrift bevat een geïntegreerd onderzoek naar geïnduceerde verdediging van *Arabidopsis* tegen een scala van pathogenen en insecten. Voor het aanschakelen van het juiste verdedigingsmechanisme produceert de plant diverse signaalmoleculen in wisselende samenstelling en hoeveelheid. Bestudering van de vertaling van deze alarmsignalen in genexpressieprofielen, en het daarmee gepaard gaande spectrum van effectiviteit leverde waardevolle inzichten op die kunnen verklaren hoe een plant zijn immunerespons kan aanpassen aan het type belager. Kennis over de regulatie van de immunerespons van planten kan bijdragen aan nieuwe concepten voor duurzame gewasbescherming.

Vivian van Oosten
 Plant-Insect Interactions
 Scientific Affairs, Groupe Limagrain
 Gestationeerd bij Nickerson-Zwaan
 Postbus 28, 4920 AA Made
 vivian.van.oosten@nickerson-zwaan.com

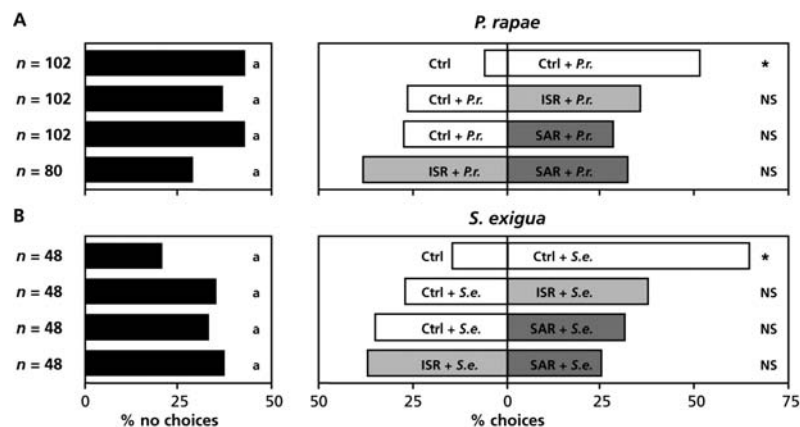
Referentie

De Vos, M., 2006. Signalen, transcriptomics en effectiviteit van geïnduceerde afweer tegen pathogenen en insecten in *Arabidopsis*. *Gewasbescherming* 37(2), 48-51.



Figuur 2. Ontwikkeling van *P. rapae* en *S. exiguua* op *Arabidopsis* planten die ISR of SAR tot expressie brengen.

Rupsen uit het eerste larvale stadium werden op individuele planten gezet, die niet geïnduceerd waren (Ctrl), of ISR of SAR tot expressie brachten. De ontwikkeling van de rupsen werd bekeken tot de verpopping. ISR werd geïnduceerd door de planten op te kweken in grond waar *Pseudomonas fluorescens* bacteriën, stam WCS417r, doorheen gemengd waren. SAR werd geïnduceerd door pre-infectie van drie bladeren per plant met avirulente *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*avrRpt2*) bacteriën. A. Relatief gewicht van *P. rapae* na 7 d ($1=64.2\text{mg}$) en *S. exiguua* na 12 d ($1=96.0\text{mg}$). Weergegeven is het gemiddelde gewicht \pm SE van de rupsen 2 d voor de eerste rups verpopte. Het aantal gewogen rupsen (n) is aangegeven in de balken. B. Gemiddeld aantal dagen \pm SE waarop de rupsen verpopten. De pictogrammen symboliseren de poppen van *P. rapae* (links) en *S. exiguua* (rechts). Asterisks geven de behandelingen aan die significant verschillend waren van de overige behandelingen ($P<0.05$).



Figuur 3. Keuzegedrag van de sluipwesp *Cotesia rubecula* in een windtunnel met twee keuzes, voor planten die ISR of SAR tot expressie brengen en vraatschade door rupsen hebben.

Aan individuele vrouwelijke *C. rubecula* sluipwespen werden twee geurbronnen aangeboden in een windtunnel. Elke geurbron bestond uit 15 *Arabidopsis* planten, die niet geïnduceerd waren (Ctrl), of microbiëel geïnduceerde ISR of SAR tot expressie brachten, met of zonder vraatschade door *P. rapae* (Pr.) of *S. exiguua* (S.e.) rupsen. Het aantal landingen op elke geurbron werd genoteerd als 'choice' (keuze). Als de sluipwesp niet landde op een geurbron, werd dit genoteerd als 'no choice' (geen keuze). In de figuur is het percentage sluipwespen met of zonder keuze weergegeven. Asterisks geven significante verschillen ($P<0.001$) aan in gemaakte keuzes tussen geurbronnen. NS en a, niet significante verschillen ($P>0.05$); n, aantal geteste sluipwespen.

PROMOTIES