

# Resistentiemechanismen van *Solanum*-soorten tegen *Myzus persicae*

Adriana Alvarez

Op 20 juni promoveerde Adriana Alvarez (Salta, Argentina) aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Resistance mechanisms of *Solanum* species to *Myzus persicae*. Promotor was Prof. Dr. M. Dicke, hoogleraar Entomologie. Co-promotoren waren Dr. W.F. Tjallingii, eveneens verbonden aan de leerstoelgroep Entomologie van Wageningen Universiteit, en Dr. B. Vosman verbonden aan Plant Research International (WUR). Het onderzoek vond zowel plaats op het Laboratorium voor Entomologie (WU) als op PRI. Financieel werd het onderzoek ondersteund door PRI en het AI an programma van de EU, voor 'high-level scholarships voor Latijns Amerika (E03D16556AR). De volledige tekst van het proefschrift is als pdf-file beschikbaar op de digitale bibliotheek van Wageningen Universiteit (<http://library.wur.nl.ezproxy.library.wur.nl/wda/dissertations/dis4220.pdf>).

## Inleiding

De aardappel *Solanum tuberosum* L. is een gewas dat zeer gevoelig is voor de bladluis *Myzus persicae* (Sulzer), de belangrijkste vector van een aantal plantenvirussen. Op dit moment zijn er nog geen resistente rassen tegen bladluizen maar van meer dan zestig wilde aardappelsoorten is wel

een zekere resistentie tegen *M. persicae* bekend. Deze soorten vertegenwoordigen een belangrijke bron die benut kan worden om resistentie over te brengen in gecultiveerde soorten. Eerst is echter meer inzicht nodig in de onderliggende mechanismen van de resistentiefactoren in dit materiaal, hun weefsellocatie en moleculaire basis.

In dit proefschrift wordt verslag gedaan van het onderzoek naar deze resistentiemechanismen die gebruikt kunnen worden om de virusoverdracht van het aardappel-bladrolvirus (PLRV) tegen te gaan. Hiervoor zijn verschillende fenotypische aspecten van resistentie en vatbaarheid onderzocht in gecultiveerde en wilde aardappelplanten. Ook is geprobeerd een relatie tussen deze fenotypische aspecten en reproductie en groei ('performance') van de bladluizen te vinden, terwijl ook de reacties van de plant op bladluiskolonisatie zijn onderzocht.

## Screening voor *M. persicae*-resistentie

De overleving en reproductie van *M. persicae* werd gevolgd op twintig knoldragende *Solanum*-genotypen, waaronder ook enkele vatbare *S. tuberosum*-cultivars. Op dezelfde genotypen werd het plant-penetratiegedrag en eventuele voedselopname uit

het floëem gedurende zes uur geregistreerd met de elektrische penetratie-gram (EPG) -techniek (Figuur 1). EPGs toonden aan dat de *Myzus*-resistenties op drie verschillende niveaus in het weefsel gelokaliseerd waren in de genotypen. Allereerst werd een duidelijke resistentie gevonden aan het bladoppervlak bij soorten met klierharen, zoals *S. berthaultii*, *S. polyadenium* en *S. tarijense*. Bekend is dat deze klierhaar-resistentie genetisch complex is, geassocieerd met ongewenste productie-eigenschappen en dus minder geschikt in veredelingsprogramma's. *S. stoloniferum* bleek een hoge resistentie te bezitten op epidermis/mesofylniveau terwijl bij *S. jameisii* en *S. tuberosum* cv. Kardal resistentiefactoren op floëemniveau aanwezig bleken. Kardal vertoonde echter een sterke reductie in resistentie met toename van de leeftijd van het blad. Jong blad bleek ook meer resistent dan oud blad in *S. capsicibaccatum*, *S. stoloniferum*, *S. berthaultii*, *S. polyadenium* en *S. tarijense*. Over het algemeen deden de bladluizen het slecht op planten met aantoonbare resistentie op basis van EPG-gegevens, die bij de meeste resistente genotypen op floëemfactoren berust. Maar sommige *Solanum*-soorten waarop de bladluizen het goed deden vertoonden toch resistentiefactoren (EPGs) die effect hadden voorafgaande aan floëemactiviteiten. Deze

PROMOTIES

pre-floëemresistentie is juist van belang ter voorkoming van PLRV-transmissie. EPGs konden dus eventueel bruikbare resistentiefactoren aantonen die niet uit *performance*-proeven bleken.

Ook *S. stoloniferum* heeft een sterke pre-floëemresistentie die niet op klierharen bleek te berusten en is daarom als modelplant in het verdere onderzoek gebruikt. Overigens bleek deze plant ook een sterke floëemresistentie te bezitten. De resistentie in deze aardappelsoort heeft alleen betrekking op *M. persicae*, niet op *Macrosiphum euphorbiae*, die het op aardappels ook goed doet.

### **De modelplant *S. stolonifera* om de reactie van *M. persicae* te vergelijken met *M. euphorbiae***

In bladluis *performance*-, 'settling'- en plantpenetratie-studies (EPGs) werden ook *S. tuberosum* controleplanten gebruikt die een grote geschiktheid vertoonden voor beide bladluissoorten. De sterke *Myzus*-resistentie van jong *S. stoloniferum*-blad lijkt een constitutieve factor. In een *settling*-gedragstest bleek dat kolonisatie door *M. persicae* of *M. euphorbiae*, voorafgaand aan de test, geen additionele resistentiecomponenten induceerde in *S. stolonifera*: niet in de bladluisgekoloniseerde (lokale) bladeren en ook niet in de niet gekoloniseerde (systemische) bladeren van de plant.

### **Genexpressie**

De genexpressie in *S. stoloniferum* in reactie op de twee bladluissoorten *M. persicae* en *M. euphorbiae* is onderzocht. Hierbij kan de combinatie *S. stoloniferum* - *M. euphorbiae*

*Figuur 1. Bladluis aan een dun gouddraadje (diam. 20 µm) gelijmd om het elektrische penetratie-gram (EPG) te registreren. Ook de plant heeft een elektrode (in de potgrond). Zodra de bladluis prikt wordt een elektrisch circuit gesloten en kunnen de EPG-signalen worden geregistreerd.*



worden gezien als compatibel; die met *M. persicae* als incompatibel. Zowel aan lokaal blad, waarop de bladluizen zaten, als aan systemisch blad is gemeten. Het bleek dat transcriptie bij ongeveer tweemaal zoveel genen veranderde als reactie op *M. euphorbiae* dan op *M. persicae*. De sterkere reactie op *M. euphorbiae* betrof vooral een verhoogde expressie van pathogenese gerelateerde genen (PR-genen), regulerende genen, en genen betrokken bij eiwitmetabolisme. Daarnaast kwamen genen gerelateerd aan algemeen metabolisme en fotosynthese verminderd tot expressie in reactie op *M. euphorbiae*. Ook werd een inductie van verhoogde expressie gemeten van genen betrokken bij celdifferentiatie en groei die mogelijk betrokken zijn bij verandering van de fysiologische status van het weefsel van 'source' naar 'sink' als reactie op de bladluizen. Daar komt nog bij dat *M. euphorbiae* ook genen activeert die betrokken zijn bij gereguleerde proteolyse (*proteasome system*), plasmodesma vorming en extracellulair transport. Dit suggereert dat het grote aantal genen met een verhoogde expressie in vooral het lokale blad bij een compatibele interactie met bladluizen gerelateerd is aan fysiologische veranderingen in de plant.

Infectie van *S. stoloniferum*-bladeren met *M. persicae* blad-

luizen leidt tot de ontwikkeling van watergevulde puistachtige structuren met veel kapot en gebarsten weefsel als gevolg van extra celdeling en celvergroting van cellen rond de vaatbundel. Bij een infectie met *M. euphorbiae* zien we een dergelijke reactie niet. Interessant is in dit verband ook dat een aanval van *M. persicae* of *M. euphorbiae* in *S. stoloniferum* leidt tot de activatie van een gen dat codeert voor een auxine-geïnduceerd SAUR (*small auxin up RNA*)-achtig eiwit. Inductie van een SAUR-transcript is beschreven na inoculatie van peper- of tomatenplanten met het virulente pathogeen *X. campestris* pv. *vesicatoria*, gepaard gaande met soortgelijke puistachtige structuren. De vorming van de puisten en de inductie van het SAUR-transcript in *S. stoloniferum* suggereren parallellen tussen de twee processen. Mogelijk spelen speeksel-eiwitten van de bladluis, afkomstig van endosymbionte *Buchnera*-bacteriën hierbij een rol. Verder onderzoek hiernaar is echter nodig.

Een ander interessant geval is *S. tuberosum* cv. Kardal, die resistentie van jong blad tegen *M. persicae* bezit (incompatibel) maar oud vergelend blad is vatbaar (compatibel), mogelijk veroorzaakt door chemische verschillen. Een genexpressiestudie na *M. persicae*-kolonisatie in oud blad

toonde geïnduceerde expressieverandering in een groter aantal genen dan in jong blad na kolonisatie, en daarin bleek slechts een klein aantal genen in expressieniveau verlaagd. Om overeenkomsten in genregulatie te vinden tussen de compatibele en incompatibele plant-bladluis interactie zijn de transcriptomics-resultaten van de twee systemen met elkaar vergeleken: (1) *S. stoloniferum* na *M. persicae* of *M. euphorbiae* kolonisatie en (2) *S. tuberosum* cv. Kardal na *M. persicae*-kolonisatie op jong en oud blad. In beide systemen werd als reactie op elk van de bladluizen een expressieverandering waargenomen van PR- en regulatorische genen, en van genen betrokken bij het eiwitmetabolisme, hetgeen wijst op activatie van de signaal-transductieroute via salicylzuur en ethyleen in zowel *S. tuberosum* als *S. stoloniferum*. Genen betrokken bij de signaal-transductie-route via jasmonzuur werden slechts in beperkte mate differentieel gereguleerd in de *S. stoloniferum*-*M. euphorbiae* interactie maar niet in de *S. tuberosum* cv. Kardal-*M. persicae* interacties.

Een groep genen vertoonde verhoogde expressie in *S. tuberosum* cv. Kardal na *M. persicae*-kolonisatie en in *S. stoloniferum* na *M. persicae* of *M. euphorbiae*-kolonisatie. Deze genen karakteriseren beide bladluis-*Solanum* spp.-interacties. De helft daarvan behoort tot de PR-eiwitgenen. Net als in de interactie tussen beide bladluissoorten en *S. stoloniferum*, worden ook in de interacties met *S. tuberosum* cv. Kardal genen in expressie verhoogd die mogelijk een rol spelen bij *source-sink*-veranderingen in het blad. Daar staat tegenover dat er geen genen waren die zowel in *M. persicae*-geïnficeerde Kardal (oude of

jonge bladeren) als in *M. persicae*- of *M. euphorbiae*-geïnficeerde *S. stoloniferum*-planten in expressie verlaagd werden. Dit suggereert dat de verlaging van genexpressie meer soortspecifiek is dan een verhoging. Compatibele plant-insectinteracties resulteerden in expressieveranderingen bij meer genen dan niet-compatibele interacties. Onder betrokken genen bevinden zich genen die gerelateerd kunnen worden aan *sink-source*-veranderingen op de plek waar de bladluizen zich voeden, mogelijk door bladluismanipulatie van genexpressie door speekselcomponenten - of - door een normale reactie van de plant op onttrekking van floëmsap door de bladluizen. Onder de differentieel gereguleerde genen bevonden zich genen betrokken bij signaaltransductieroutes, regulering en signalering, eiwitmetabolisme, celstofwisseling, transport en secundair metabolisme. In de incompatibele interactie lijkt de transcriptionele respons van de plant beperkt te zijn.

Het effect van een PLRV-infectie in planten van cv. Kardal op het bladluisgedrag werd tevens in een keuzeproef onderzocht. Er bleek een voorkeur voor (attractie-) geurstoffen van PLRV-geïnficeerd oud blad bij *M. persicae* te bestaan maar in jong, apicaal blad bleek er geen verschil in het aantal bladluizen dat door PLRV-geïnficeerd en niet-geïnficeerd blad werd aangetrokken. Met betrekking tot het penetratiegedrag van de bladluizen, onderzocht met de EPG-techniek, is ook een aantal verschillen gevonden in plant-penetratie tussen geïnficeerde en niet-geïnficeerde planten. Deze verschillen waren alleen meetbaar nadat planten zichtbare PLRV-symptomen vertoonden. Hoewel de bladluizen op deze PLRV-

geïnficeerde planten sneller floëemactiviteiten vertoonden – wat er op wijst dat stiletpenetratie gemakkelijker verloopt – werd er geen versneld begin van het penetratiegedrag gevonden dat op de stimulerende werking van geurstoffen zou wijzen. Mogelijk kan op basis van deze resultaten een verhoogde verspreiding van het PLRV verwacht worden omdat geïnficeerde planten iets meer bladluizen aantrekken dan niet-geïnficeerde, maar overtuigend is deze suggestie niet.

### Conclusies

De resultaten verkregen in dit onderzoeksproject met betrekking tot bladluis-*performance*, plant-penetratiegedrag, kolonisatie, 'settling-gedrag' en genexpressie dragen bij aan een beter begrip van de plantenreactie op bladluizen en vormen de basis voor het ontrafelen van het resistentiemechanisme op metabool-, moleculair en genetisch niveau. Perspectieven om schade in aardappel te minimaliseren zitten vooral in een combinatie van bladluis- en virusresistentie. Verder wijst dit onderzoek op een mogelijke rol van endosymbionten in de plant-bladluis interactie. Nader onderzoek hiernaar is echter nodig. De resultaten van dit onderzoek vormen mogelijk een goede basis voor toekomstige veredeling op bladluisresistentie.