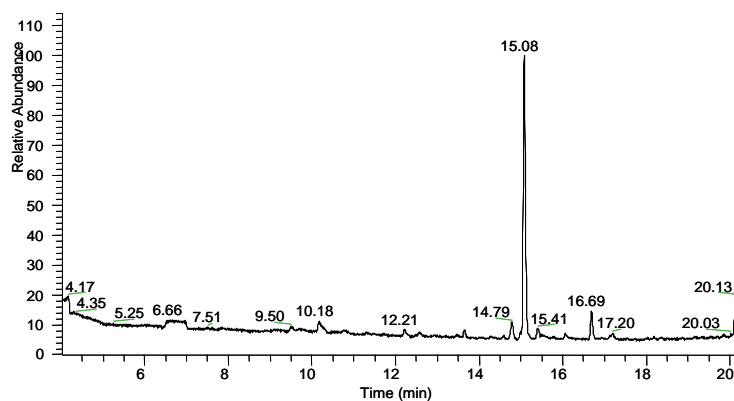




WAGENINGEN UNIVERSITEIT/  
WAGENINGEN UNIVERSITY  
LABORATORIUM VOOR ENTOMOLOGIE/  
LABORATORY OF ENTOMOLOGY

**Geurkarakterisering van verschillende transgene  
aardappelplanten en de aantrekkingskracht hiervan op  
*Phytoseiulus persimilis***



No.: 05.12  
Naam: Milan van der Meer  
Periode: Maart-Juli 2005  
1<sup>e</sup> Examinator: Iris Kappers  
2<sup>e</sup> Examinator: Marcel Dicke



WAGENINGEN UNIVERSITEIT/  
WAGENINGEN UNIVERSITY  
LABORATORIUM VOOR ENTOMOLOGIE/  
LABORATORY OF ENTOMOLOGY

**Geurkarakterisering van verschillende transgene  
aardappelplanten en de aantrekkingskracht hiervan op  
*Phytoseiulus persimilis***

No.: 05.12  
Naam/Name: Milan van der Meer  
Periode/Period: Maart-Juli 2005  
1<sup>e</sup> Examiner: Iris Kappers  
2<sup>e</sup> Examiner: Marcel Dicke

## **Voorwoord**

Hierbij wil ik de mensen van PRI en entomologie bedanken voor hun medewerking en advies tijdens de periode van mijn afstudeervak. In het bijzonder wil ik Iris Kappers, Rieta Gols en Marcel Dicke bedanken voor hun begeleiding en advies.

## Samenvatting

Planten kunnen zichzelf tegen plaaginsecten verdedigen door natuurlijke vijanden aan te trekken d.m.v. het produceren van aantrekkelijke geurstoffen. Deze geurstoffen worden geproduceerd als de plant wordt aangetast door een plaaginsect. Voor het aantrekken van natuurlijke vijanden moeten deze geurstoffen in de juiste concentratie en verhoudingen worden geproduceerd.

In dit onderzoek worden 31 transgene aardappellijnen van twee cultivars (Kardal en RJ) onderzocht. In deze planten zijn cDNA's ingebouwd die coderen voor de enzymen die  $\alpha$ -pineen of linalool (LIN-planten) aanmaken. De planten die  $\alpha$ -pineen zouden moeten aanmaken hebben tegelijkertijd het cDNA ingebracht gekregen die  $\alpha$ -pineen in myrtenol omzet. Er zijn twee manieren gebruikt voor het inbrengen hiervan. 1. Middels een tweetal constructen die elk een van beide cDNA's bevatten (MYR-planten) en 2. D.m.v. een dubbelconstruct waar beide cDNA's achter elkaar in eenzelfde construct zijn geplaatst (DC-planten). Van de planten is d.m.v. een headspace analyse en een endogene analyse onderzocht welke geuren de plant uitstoot en welke geuren zich in het blad bevinden. Met de planten die linalool aanmaken is onderzoek gedaan naar het gedrag van roofmijten met behulp van Y-buis testen.

Uit de resultaten blijkt dat alle planten die linalool zouden moeten produceren dit ook werkelijk doen en dit ook uitstoten in de headspace. Naast linalool werd er ook een emissie van dimethyl nonatriene en andere geurstoffen teruggevonden. De geurstoffen verschilden in verhouding wanneer er op verschillende tijdstippen een analyse werd gedaan. Bij de MYR-planten en DC-planten werd er, op een enkele uitzondering na, geen  $\alpha$ -pineen in het blad gevonden. Wel werd er bij bijna alle planten een emissie van  $\alpha$ -pineen gevonden in de headspace. Myrtenol werd door drie MYR-planten uitgestoten en door één DC-plant. Bij één MYR-plant is er ook myrtenol in het blad teruggevonden. Planten van de cultivar Kardal vertoonden een emissie van myrtenol bij de MYR-planten terwijl de cultivar RJ myrtenol vertoont bij een DC-plant. De MYR-planten produceren voornamelijk decanal, humuleen en cadineen, maar deze stoffen worden niet uitgestoten. De DC-planten produceren voornamelijk  $\beta$ -elemeen,  $\beta$ -farneseen, humuleen, germacreen D en muuroleen. Ook van deze stoffen vond er geen emissie plaats.

Uit het gedragsonderzoek met *Phytoseiulus persimilis* kwam naar voren dat de roofmijten erg gevoelig zijn voor de concentratie linalool. Doordat de planten door de tijd heen verschillende hoeveelheden linalool uitstootten waren er verschillen tussen de testen met dezelfde planten. Één plant (LIN-K-4) vertoonde een significante aantrekkingskracht op de roofmijten. Uit het onderzoek blijkt dat het van groot belang is, te weten te komen hoeveel linalool de plant uitstoot op het tijdstip van de Y-buis testen.

## Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	1
1.1. Directe en indirecte afweermechanismen.....	1
1.2. <i>Phytoseiulus persimilis</i> .....	3
1.3. Geurstoffen.....	4
1.4. Doelstelling.....	6
2. Materiaal en Methoden.....	7
2.1. Planten.....	7
2.2. Geurkarakterisering.....	8
2.2.1. Endogene geurkarakterisering.....	9
2.2.2. Geurkarakterisering d.m.v. een headspace.....	9
2.3. <i>Phytoseiulus persimilis</i> .....	10
2.4. Experiment I.....	10
2.5. Experiment II.....	11
3. Resultaten.....	12
3.1. Algemeen.....	12
3.2. Geurkarakterisering.....	12
3.2.1. Linalool planten: eerste analyse.....	12
3.2.2. Linalool planten: tweede analyse.....	15
3.2.3. Myrtenol planten.....	18
3.2.4. Dubbel construct planten.....	20
3.3. PCA (Principal Component Analysis).....	22
3.4. Gedragsonderzoek.....	25
3.4.1. Aantrekkingskracht van verschillende concentraties linalool op roofmijten.....	25
3.4.2. Aantrekkingskracht van transgene aardappelplanten op roofmijten.....	25
4. Discussie.....	27
4.1. Algemeen.....	27
4.2. Karakterisatie van geurcomponenten.....	27
4.2.1. LIN-planten.....	27
4.2.2. MYR-planten.....	28
4.2.3. DC-planten.....	28
4.3. PCA.....	29
4.4. Gedragsonderzoek.....	30
4.4.1. Aantrekkingskracht van verschillende concentraties linalool op roofmijten.....	30
4.4.2. Aantrekkingskracht van transgene aardappelplanten op roofmijten.....	30

5. Conclusie en aanbevelingen .....	32
5.1. Conclusie .....	32
5.2. Aanbevelingen voor vervolgonderzoek.....	32
Referenties.....	34
Bijlagen .....	I
Bijlage I: Geurkarakterisering d.m.v. headspace.....	II
Bijlage II: Endogene geurkarakterisering.....	VIII

# 1. Inleiding

## 1.1. Directe en indirecte afweermechanismen

Wanneer planten worden aangevallen door plantetende insecten beschermen deze zich door middel van verschillende afweermechanismen. Omdat deze mechanismen door de insecten worden geïnduceerd, worden het geïnduceerde afweermechanismen genoemd (Roda en Baldwin, 2002).

Als een plant wordt aangetast door bijvoorbeeld rupsen herkent de plant componenten in het spug van de rups en weet hierdoor dat de beschadiging door een insect wordt veroorzaakt. De reactie van de plant vindt niet alleen plaats op het blad dat wordt aangetast maar vindt door de hele plant plaats (Dicke, 2005). Ook kan de plant het verschil waarnemen tussen verschillende soorten rupsen en zelfs het verschil in jonge en oude rupsen.

De geïnduceerde afweermechanismen kunnen worden ingedeeld in directe en indirecte afweermechanismen. De directe afweermechanismen zorgen er in een directe manier voor dat de aantasting van de plant door plantetende insecten afneemt of stopt (Roda en Baldwin, 2003). De plant maakt dan toxische stoffen of verteringsremmers die negatieve invloeden hebben op deze insecten (Rhoades, 1985; Van Poecke en Dicke, 2004). Andere vormen van directe afweermechanismen zijn het aanmaken van wrattenweefsel waardoor de eieren van kevers uitdrogen of het verschroeien van plantencellen rondom vlindereieren waardoor ook deze uitdrogen (Dicke, 2005).

Het nadeel van directe afweermechanismen is dat de plantetende insecten resistent kunnen worden. Bij het grote koolwitje herkent de plant het insect doordat deze een bepaald verteringsenzym aanmaakt. Wanneer deze rups een ander enzym aanmaakt voor zijn vertering zal de plant het insect niet meer herkennen. Het insect zal ongestoord de plant kunnen blijven aantasten tot de plant ook dit enzym herkent. Een ander nadeel is het tegenwerkende effect van bepaalde toxische stoffen. Wanneer de plant door een plaag wordt aangetast maakt deze andere afweerstoffen aan dan wanneer deze door een ziekte wordt aangetast. Wanneer een plant door een insect wordt aangetast maakt deze meestal jasmonzuur aan. Wanneer echter de plant wordt aangetast door een ziekteverwekker, zoals bacteriën, maakt de plant vaak salicylzuur aan. Deze twee stoffen werken elkaar tegen. Wanneer de plant één van deze aanmaakt wordt de productie van de andere geblokkeerd (Traw *et al.*, 2003). Sommige insecten maken hier gebruik van door de aanmaak van salicylzuur bij de plant te induceren waardoor de aanmaak van jasmonzuur wordt geblokkeerd en de plant zich niet meer tegen insecten kan verdedigen (Dicke, 2005).

Naast deze directe afweermechanismen zijn er ook indirecte afweermechanismen. Hierbij wordt de effectiviteit van de natuurlijke vijanden van de plantetende insecten vergroot. Dit kan gebeuren doordat de plant een beschutting geeft aan de natuurlijke vijanden of doordat de plant zorgt voor alternatief voedsel (Price, 1980). Ook kan de plant geuren aanmaken waar de natuurlijke vijanden van de belagers op af komen. Deze geuren worden door de plantetende insecten geïnduceerd. Zo maken onder andere komkommer, tomaat, aubergine, gerbera, katoen, roos, peer en appel geurstoffen aan wanneer deze planten worden aangetast door spintmijt (*Tetranychus urticae*) (Dicke *et al.*, 1990; Takabayashi *et al.*, 1994a; Van den Boom *et al.*, 2002). Op deze geuren komen enkele natuurlijke vijanden van spintmijt af. Uit eerdere onderzoeken is gebleken dat de roofmijt *Phytoseiulus persimilis* (Bouwmeester *et al.*, 2003; Choh *et al.*, 2004; De Boer en Dicke, 2004; Dicke *et al.*, 1999; Dicke *et al.*, 2003; Gols *et al.*, 2003) en de roofinsecten *Scolothrips takahasii* (Shimoda *et al.*, 2002) en *Oligota kashmirika benefica* (Shimoda en Takabayashi, 2001) worden aangetrokken door geuren die limaboon produceert wanneer de bladeren door spintmijten worden aangetast. Zo is ook van verschillende andere parasitaire wespen, roofmijten en kevers bekend dat ze op insectgeïnduceerde geurstoffen afkomen (Choh *et al.*, 2004; De Moraes *et al.*, 1998; Dicke, 2005; Han en Chen, 2002; Maeda *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 1993; Takabayashi *et al.*, 1995; Turlings *et al.*, 1990; Van den Boom *et al.*, 2002).

De aanmaak van de geuren wordt veroorzaakt doordat de plant speekselcomponenten van het insect herkent (Turlings *et al.*, 1990). Deze speekselcomponenten zorgen ervoor dat de productie van bepaalde hormonen, zoals jasmonzuur, wordt verhoogd (Van Poecke en Dicke, 2004). De betrokkenheid van hormonen bij de aanmaak van deze insectgeïnduceerde geuren geeft aan dat het hier om een actief proces gaat. Het zijn geen opgeslagen geurcomponenten die vrij komen doordat het weefsel wordt aangetast maar juist stoffen die “*de novo*” worden geproduceerd (Van Poecke en Dicke, 2004). De aanmaak van deze geuren en de aantrekking van natuurlijke vijanden wordt beïnvloed door onder andere abiotische factoren. Zo worden er meer geurcomponenten aangemaakt en meer natuurlijke vijanden aangetrokken wanneer de lichtintensiteit hoog is of als de plant waterstress heeft (Takabayashi *et al.*, 1994a). Doordat het een indirect mechanisme is, is het voor de plantetende insecten moeilijker om er resistenties voor op te bouwen (Van Poecke en Dicke, 2004).

De directe en indirecte afweermechanismen kunnen elkaar echter ook tegenwerken. Als de plant zijn directe afweermechanisme gebruikt door toxische stoffen aan te maken en de insecten eten van de bladeren kunnen de insecten minder aantrekkelijk worden voor de natuurlijke vijanden (Van Poecke en Dicke, 2004). Uit eerder onderzoek is gebleken dat het directe afweermechanisme een negatieve invloed heeft op het percentage uitgekomen wespen wanneer de eitjes van deze worden geparasiteerd in rupsen (Thaler, 2002). Het lagere



percentage uitgekomen wespen kan liggen aan een vermindering in parasitisme van de rupsen of een lagere overlevingskans van de larven in de rupsen (Thaler, 2002).

## 1.2. *Phytoseiulus persimilis*

Deze roofmijt is oorspronkelijk afkomstig uit Chili. De roofmijt heeft een lichtrode kleur en is 0,5 mm groot, ongeveer even groot als zijn prooi de kasspintmijt (*Tetranychus urticae*).

Doordat *P. persimilis* veel mobieler is dan de kasspintmijt en er actief naar op zoek gaat, is deze roofmijt tegenwoordig een veel gebruikte biologische bestrijder in de glastuinbouw.

De vrouwtjes roofmijten leggen hun eitjes vlakbij de spint kolonie. Deze eitjes zijn twee keer zo groot als de eitjes van de spintmijt. Als de eitjes van de roofmijt na 2-3 dagen zijn uitgekomen volgt het larvenstadium. In dit stadium eet de larve nog niet. Het larvenstadium wordt gevolgd door het protonimfe-, het deutonimfe en het adulte stadium (Fig. 1.1). De ontwikkeling duurt 5 tot 25 dagen bij een temperatuur van respectievelijk 30°C en 15°C (Anoniem, 2005). Nadat de roofmijt volwassen is duurt het ongeveer twee dagen (bij 20°C) voor de roofmijt eitjes legt. Dit kan echter alleen als er bevruchting plaats vindt. Bij 20°C legt een vrouwtje gedurende 22 dagen ongeveer 54 eitjes (Anoniem, 2005). Er komen ongeveer viermaal zoveel vrouwtjes als mannetjes voor.

Onder normale omstandigheden groeit de roofmijt populatie sneller dan de spintmijt populatie. Wanneer het echter erg warm is (30°C) of wanneer het erg droog is (RV < 30%) groeit de populatie minder snel en loopt de bestrijding minder goed.

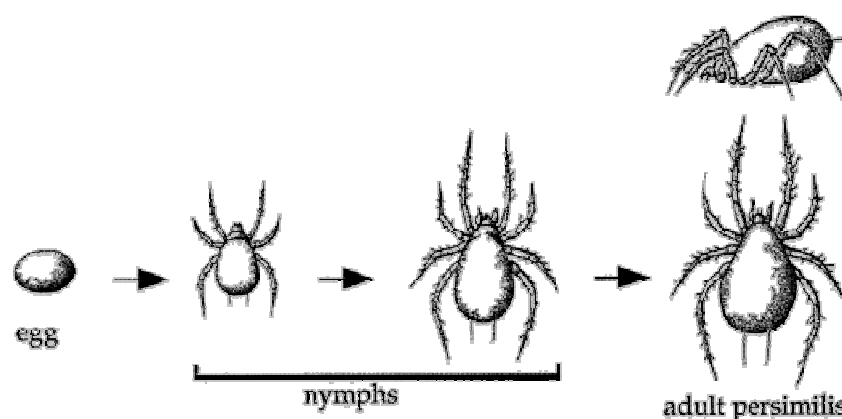


Fig. 1.1. Verkorte levenscyclus van de roofmijt *Phytoseiulus persimilis* (bron: [www.beneficialbugs.com.au](http://www.beneficialbugs.com.au))

*P. persimilis* is een selectieve bestrijder en eet praktisch uitsluitend spintmijten. Wanneer er geen spintmijten aanwezig zijn eet de roofmijt haar soortgenoten op. De nimfen eten enkel spinteitjes en protonimfen terwijl de volwassen roofmijt elk stadia van de spintmijt eet. Een volwassen roofmijt eet dagelijks ca 20 spinteitjes of larven, 13 protonimfen of 5 volwassen spintmijten (Anoniem, 2005). Doordat de roofmijt zich snel kan ontwikkelen en een grote hoeveelheid spintmijt per dag eet kan deze een spinthaard volledig uitroeien. Wanneer dit gebeurd gaan de volwassen roofmijten actief op zoek naar een nieuwe spinthaard.

### 1.3. Geurstoffen

De geuren die door de planten worden geproduceerd, na aantasting door insecten, verschillen kwalitatief en kwantitatief tussen verschillende planten. Deze verschillen ontstaan door verschillende factoren zoals plantsoort, plantcultivar, leeftijd van het blad, bladweefsel maar ook het soort herbivoor (Bouwmeester *et al.*, 2003; Takabayashi *et al.*, 1994a, 1994b, 1995; Takabayashi en Dicke, 1996; Turlings *et al.*, 1998; Gouinguéné *et al.*, 2001). Als verschillende plantsoorten worden aangetast door dezelfde insecten verschillen de geuren kwalitatief. Als echter gelijksoortige planten worden aangetast door verschillende insecten zijn de geuren kwalitatief hetzelfde en verschillen alleen in verhouding van componenten (Dicke, 1999). In eerder onderzoek is aangetoond dat natuurlijke vijanden onderscheid kunnen maken tussen geuren die door prooien of niet-prooien worden geïnduceerd (De Moraes *et al.*, 1998). De geuren die door de plant worden aangemaakt verschillen ook tussen mechanisch aangebrachte schade en door insect aangebrachte schade. Een andere manier om planten dezelfde geuren te laten produceren, als die ze aanmaken wanneer ze door insecten worden aangetast, is ze te besproeien met jasmonzuur (JA). JA is een planthormoon waarvan de aanmaak wordt verhoogd wanneer de plant door een insect worden aangetast (Reinbothe *et al.*, 1994). Roofmijten worden aangetrokken door JA geïnduceerde plantgeuren maar prefereren echter spintmijt geïnduceerde plantgeuren. (Gols *et al.*, 2003; Dicke *et al.*, 1999). De geurcomponenten geïnduceerd door JA lijken erg veel op de geurcomponenten geïnduceerd door spintmijten maar zijn dus niet hetzelfde. Belangrijke componenten van spintmijt geïnduceerde plantgeuren zijn methyl salicylate, linalool, (*E*)- $\beta$ -ocimeen en (*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (Van den Boom, 2004; Dicke *et al.*, 1990). Het wil echter niet zeggen dat de roofmijt *P. persimilis* wordt aangetrokken wanneer de plant deze geuren produceert. Het gaat om de totale samenstelling van de geurenmix (Dicke *et al.*, 1999). Planten kunnen zelfs verschillende geuren produceren die specifiek zijn voor de verschillende stadia van een plantetend insect waardoor de biologische vijand zijn prooi in de geschiktste stadia kan lokaliseren (Takabayashi *et al.*, 1995). De geuren die de plant aanmaakt kunnen in

drie groepen worden ingedeeld (Turlings *et al.*, 1995; Laughrin *et al.*, 1994). Als eerste de geuren die direct vrijkomen nadat de plant wordt beschadigd en de aanmaak daarna snel afneemt. Voorbeelden hiervan zijn (*Z*)-3-Hexanol en (*E*)-2-Hexanal. Als tweede de geuren die afnemen wanneer het blad niet meer wordt aangetast. Dit zijn waarschijnlijk stoffen die zich in het blad bevinden en vrijkomen doordat het blad wordt aangetast.  $\alpha$ -pineen is hier een voorbeeld van. En als laatste zijn er geuren die pas worden aangemaakt enkele uren nadat de plant is aangetast. Hieronder bevindt zich onder andere linalool.

Er zijn verschillende manieren om de aantrekkingskracht van bepaalde geuren op natuurlijke vijanden te bestuderen. Zo kan de geur in pure vorm worden getest of er kunnen planten voor worden gebruikt. Het nadeel van geuren testen in pure vorm, is dat de geuren in de juiste concentraties moet worden getest. Ook worden de natuurlijke vijanden vaak door een mengsel van geurcomponenten aangetrokken waardoor de geuren in mengsels moeten worden aangeboden. Dit veroorzaakt weer moeilijkheden doordat de geurcomponenten in de juiste verhoudingen moeten worden aangeboden. Voor de bestudering van de aantrekkingskracht van bepaalde geuren worden in dit onderzoek genetisch gemodificeerde planten gebruikt. In deze planten zijn cDNA's ingebracht die coderen voor de enzymen die bepaalde geurstoffen aanmaken. Hierdoor produceren de planten geuren die ze normaal niet aanmaken of produceren de geurstoffen in andere verhoudingen. Door de planten met behulp van gaschromatografie te karakteriseren wordt gekeken in welke mate de planten deze geurstoffen aanmaken en welke andere stoffen de plant produceert. Met deze planten worden experimenten gedaan met betrekking tot de aantrekkingskracht van natuurlijke vijanden op onder andere verschillende concentraties en verschillende verhoudingen van componenten. Nadat een tabakspiant was getransformeerd met drie monoterpeen synthasen uit citroen produceerde de plant 7 nieuwe monoterpenen (Lücker *et al.*, 2002). Transformatie met aardbei linalool synthase heeft in aardappel geleid tot het aanmaken van hoge concentraties linalool en glycosides van linalool. Door middel van een Y-buis experiment werd aangetoond dat de transgene planten aantrekkelijker waren voor roofmijten dan de wildtypen (Bouwmeester *et al.*, 2003).

In dit onderzoek worden transgene aardappelplanten gekarakteriseerd die cDNA's bevatten coderend voor linalool synthase,  $\alpha$ -pineen synthase en geraniol synthase (Fig. 1.2). Van de planten met cDNA voor linalool synthase zal de aantrekkingskracht op roofmijten worden onderzocht. Van  $\alpha$ -pineen is bekend dat het een aantrekkingskracht heeft op verschillende keversoorten (Siegfried, 1987; Mizell *et al.*, 1984; Chiéner en Philogéne, 1989). Ook geraniol heeft een lokkende werking op kevers (Ruther, 2004). Uit eerder onderzoek is gebleken dat roofmijten zich aangetrokken voelen tot linalool bij concentraties van 0,2; 2 en 20  $\mu$ g. (Dicke *et al.*, 1990) Ook is er voor parasitaire wespen een aantrekkingskracht gevonden voor linalool (Ramachandran, *et al.*, 1991).

Wanneer deze stoffen een aantrekkingskracht hebben op roofmijten kunnen ze mogelijk in de plant worden veredeld. De planten maken deze geurstoffen dan in de juiste concentraties aan wanneer zij door insecten worden aangevallen. Op deze wijze kan de effectiviteit van biologische controle worden verbeterd.

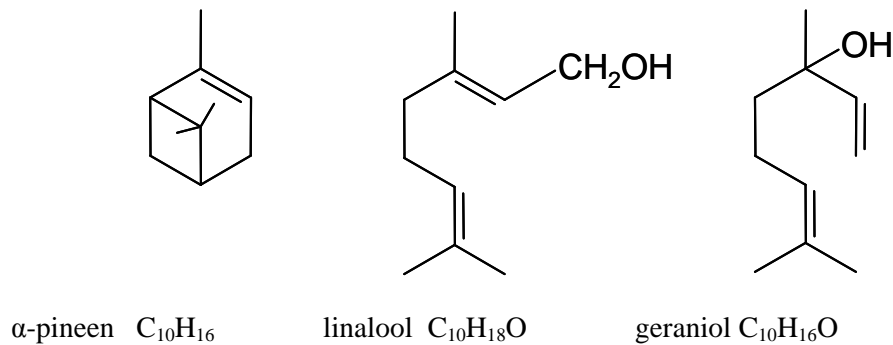


Fig. 1.2. Molecuul structuur en formule van  $\alpha$ -pineen, linalool en geraniol.

#### 1.4. Doelstelling

In dit onderzoek zullen transgene aardappelplanten, waarvan cDNA's zijn ingebracht die coderen voor enzymen die  $\alpha$ -pineen, myrtenol en linalool aanmaken, worden gekarakteriseerd met behulp van gaschromatografie gekoppeld aan een massaspectrometer. Er zal voornamelijk gekeken worden of de planten deze geurcomponenten aanmaken (kwalitatieve analyse). Hiernaast zal worden gekeken welke verschillen er zijn tussen de transgene en niet-transgene aardappelplanten m.b.t. andere geurcomponenten.

Om de aantrekkingskracht van  $\alpha$ -pineen, geraniol en linalool op roofmijten te testen zullen deze stoffen in verschillende concentraties worden getest met behulp van een Y-buis. De aantrekkingskracht van transgene planten zullen tevens worden getest op de roofmijt *P. persimilis* in vergelijking met niet-transgene aardappelplanten met behulp van een Y-buis.

## 2. Materiaal en Methoden

### 2.1. Planten

De planten die werden gebruikt voor het experiment zijn genetisch gemodificeerde aardappelplanten van de cultivars Kardal en RJ (Tabel 2.1). In deze planten zijn eerder cDNA's ingebracht die coderen voor enzymen die de stoffen linalool (LIN-planten),  $\alpha$ -pineen of geraniol (GER-planten) aanmaken (Fig. 2.1). Bij de planten die het cDNA bevatten die codeert voor  $\alpha$ -pineen synthase is tegelijkertijd ook een ander cDNA (P450) ingebouwd waardoor  $\alpha$ -pineen kan worden omgezet in myrtenol. Dit cDNA is op twee manieren ingebracht namelijk apart van het cDNA dat codeert voor het enzym dat  $\alpha$ -pineen aanmaakt (MYR-planten) en d.m.v. een dubbelconstruct waar het cDNA van beide op zit (DC-planten). Voor de controle is een wildtype van de cultivar Kardal gebruikt. De planten zijn *in vitro* opgekweekt. Van deze planten zijn kopstekjes gesneden om ze *in vitro* aan te houden, de overgebleven plantjes zijn in een bak met gesteriliseerde grond geplant. De plantjes zijn in een klimaatcel opgekweekt bij een hoge luchtvochtigheid en assimilatiebelichting. Na twee weken (4-04-2005) zijn de LIN-, MYR-, en DC-plantjes in een kas geplaatst waar ze bij een dag/nacht temperatuur van 20°C/18°C en met assimilatiebelichting (daglengte 16 uur) verder zijn afgehard. Door tijdgebrek zijn de GER-plantjes alleen *in vitro* aangehouden. Van de plantjes in de kas zijn  $\pm 5$  stekjes gesneden en opgekweekt. Wanneer de plantjes groter waren dan  $\pm 10$  cm werden deze opnieuw gestekt. Dit werd gedaan omdat de plantjes niet te groot mochten worden aangezien ze dan niet meer in de potten van de olfactometer pasten.

In de periode waarin de proeven zijn gedaan hebben de planten 2 keer een voedingsoplossing gekregen met 5 ml Pokon (Chrysal) per bak waarin 40 plantjes stonden. Dit was na 10 dagen en na 37 dagen. Na ongeveer 5 weken zijn de plantjes bespoten met Conserve tegen thrips en met Nissorun en Torque tegen spint.

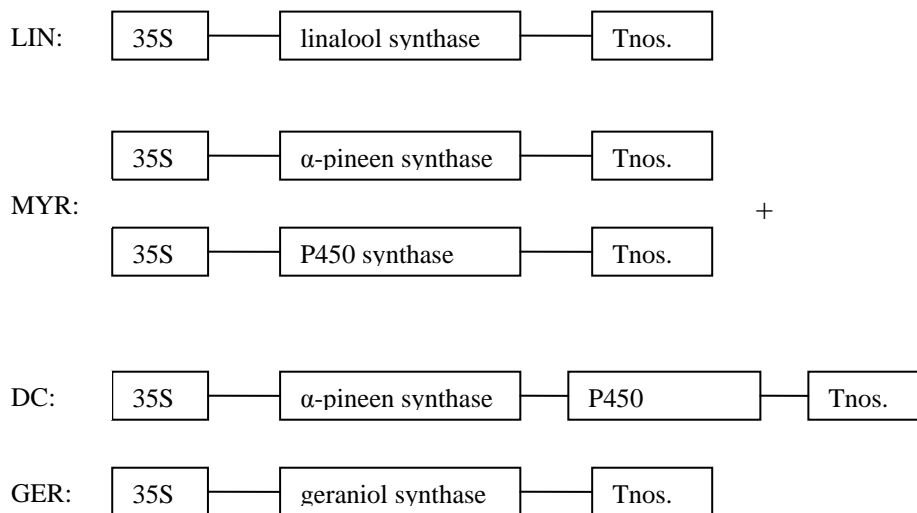


Fig. 2.1. Manier van inbrengen cDNA's in aardappelplanten die coderen voor enzymen (35S, P450) die linalool (LIN),  $\alpha$ -pineen, myrtenol (MYR, DC) en geraniol (GER) aanmaken.

Tabel 2.1. Aardappellijnen gebruikt in dit onderzoek waar verschillende cDNA's zijn ingebouwd die coderen voor de enzymen die de stoffen linalool en  $\alpha$ -pineen aanmaken. De letters K en RJ staan voor de cultivars Kardal en RJ.

Linalool	$\alpha$ -pineen	$\alpha$ -pineen (dubbel construct)
LIN-K-4	MYR-K-2	DC-K-1
LIN-K-9	MYR-K-3	DC-K-5
LIN-K-12	MYR-K-4	DC-K-7
LIN-K-15	MYR-K-9	DC-K-9
LIN-K-16	MYR-K-10	DC-RJ-8
LIN-RJ-6	MYR-K-16	DC-RJ-10
LIN-RJ-8	MYR-K-21	DC-RJ-14
LIN-RJ-13	MYR-RJ-7	DC-RJ-16
LIN-RJ-24	MYR-RJ-12	
	MYR-RJ-13	
	MYR-RJ-15	
	MYR-RJ-18	

## 2.2. Geurkarakterisering

De geurkarakterisering van de aardappelplanten zijn op verschillende manieren en verschillende tijdstippen gedaan. Er is een endogene geurkarakterisering gedaan en een d.m.v. een headspace.

### 2.2.1. Endogene geurkarakterisering

Bij de endogene geurkarakterisering wordt er gekeken naar de geurstoffen die zich in het blad bevinden. Vijf weken nadat de aardappelplantjes in de kas zijn geplaatst vond de eerste geurkarakterisering plaats. Dit werd gedaan door van net gestekte plantjes 1 a 2 blaadjes van  $\pm 1$  cm in een plastic buisje te stoppen en direct te bevriezen in vloeibaar stikstof. De bevroren blaadjes werden bewaard bij een temperatuur van  $-80^{\circ}\text{C}$ . Van de blaadjes werd het gewicht bepaald met behulp van een balans (Mettler AE 260) waarna deze in een glazen vial werden gestopt. In een flowkast werd hierbij 1 ml dichloormethaan (Merck KGaA) gepipetteerd. De monsters werden in de koelkast bewaard voor 2 dagen. Hierna is het chlorofyl uit de monsters gehaald door de vloeistof door een capillair met glaswol en koolstof te pipetteren. Het glaswol zorgde ervoor dat er geen koolstof in het monster kwam. De monsters werden geanalyseerd door middel van een GC-MS met vloeistof-injectie (5890 series II, Hewlett-Packerd) met een 30-m x 0.25-mm filmoppervlakte en 0.25- $\mu\text{m}$  filmdikte (5MS, Hewlett-Packerd) en een 'selective detector' (model 5972a, Hewlett-Packerd). De GC was geprogrammeerd met een begin temperatuur van  $45^{\circ}\text{C}$  voor 1 minuut, met een verhoging van  $10^{\circ}\text{C}$  per minuut tot  $220^{\circ}\text{C}$ . Deze laatste temperatuur werd nog voor 5 minuten aangehouden. De injectiepoort-temperatuur, interfacetemperatuur, en MS-temperatuur waren respectievelijk  $250^{\circ}\text{C}$ ,  $290^{\circ}\text{C}$  en  $180^{\circ}\text{C}$ . De kolomstroom werd constant gehouden op  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . Het scannen werd uitgevoerd van 30 tot 250 atm (atomic mass units). Op deze manier kon er worden geanalyseerd welke geurcomponenten er in het blad van de plant aanwezig waren.

### 2.2.2. Geurkarakterisering d.m.v. een headspace

Bij de geurkarakterisering d.m.v. een headspace wordt er gekeken naar de stoffen die een plant uitstoot. Vijf dagen nadat de plantjes in de kas zijn geplaatst vond deze geurkarakterisering plaats. Van elk plantje werden 2 blaadjes van  $\pm 1$  cm in een glazen vial gedaan en hierbij werd  $10\mu\text{l}$  leidingwater gepipetteerd zodat de blaadjes niet uitdroogden. De geuren zijn opgevangen d.m.v. de SPME-methode (solid phase micro extraction). De fiber van het SPME-apparaat, gecoat met  $100 \mu\text{m}$  polydimethylsiloxane, werd in de glazen vial geprikt (deze raakte het blad niet) waarna de geurstoffen door de fiber werden opgenomen gedurende 30 minuten. De geurstoffen werden geanalyseerd met de GC-MS. Op deze manier kon er geanalyseerd worden welke geurcomponenten de bladeren van de plant werkelijk uitstoten. Deze geurkarakterisering is voor de LIN-planten anderhalve maand later herhaald.

### 2.3. *Phytoseiulus persimilis*

De roofmijt *P. persimilis* wordt opgekweekt op, met spintmijt (*Tetranychus urticae*) geïnfecteerde, lima boon (*Phaseolus lunatus*) bladeren in een klimaatcel bij een temperatuur van 23°C en assimilatiebelichting. Om de roofmijten uit te hongeren werden ze anderhalf tot twee uur van te voren verzameld. Dit werd gedaan door ze met behulp van een penseeltje van de lima boon bladeren te verwijderen en ze per roofmijt in een plastic buisje te plaatsen. De roofmijten zijn tot aan het experiment bewaard bij kamertemperatuur en belichting.

### 2.4. Experiment I

De aantrekkingskracht van de geuren in pure vorm op *P. persimilis* zijn getest in een glazen Y-buis olfactometer (Fig. 2.2.). Lucht gefilterd d.m.v. actieve kool werd met 4 L/min naar de twee geurbronnen (armen) geleid en aan het einde van de Y-buis afgezogen (8 L/min). Door de Y-buis loopt een metalen draad waar de roofmijt aan het begin op werd gezet zodat deze tegen de wind in loopt. De roofmijten kregen de keus tussen een geur opgelost in paraffine olie en enkel paraffine olie. In de ene arm is een geur ingebracht door 0,1 ml van de geurstof op een filtreerpapierje te pipetteren en deze in de arm te leggen. In de andere arm werd een filtreerpapierje gelegd met 0,1 ml van het oplosmiddel (paraffine olie). Om ervoor te zorgen dat er een duidelijk verschil in geur tussen de armen was, werd er 5 minuten gewacht waarna er nieuwe filtreerpapierjes met de oplossingen in de armen werden gelegd. De roofmijt werd aan het begin van de metalen draad gezet. Als de roofmijt aan een van de einden van de metalen draad aankwam was er een keus gemaakt. De roofmijt werd verwijderd en er werd een nieuwe roofmijt getest. Voor elke roofmijt werd een nieuw filtreerpapierje gebruikt. Als de roofmijt na 5 minuten geen van de twee uiteinden had bereikt was er geen keuze gemaakt. Wanneer de roofmijt meer dan 2 keer van de metalen draad op het glas liep werd de roofmijt verwijderd en was er geen keus gemaakt. Na 5 roofmijten werden de filtreerpapierjes met geuren van arm gewisseld. Er werd weer 5 minuten gewacht waarna er weer een nieuw filtreerpapierje per roofmijt werd gebruikt. Voor elke test werden 20 roofmijten getest. De testen zijn twee keer herhaald op verschillende dagen.

De drie geurstoffen die zijn gebruikt zijn linalool (Aldrich), geraniol (Sigma) en  $\alpha$ -pineen (Sigma). Door tijdgebrek zijn er alleen voor linalool genoeg herhalingen gedaan om deze te kunnen beoordelen. De geuren zijn getest bij de concentraties 0.02; 0.2; en 2 $\mu$ g. De waarnemingen zijn geanalyseerd met de Chi kwadraat toets. Wanneer  $\alpha$  kleiner is dan 0.05 zijn de verschillen significant.



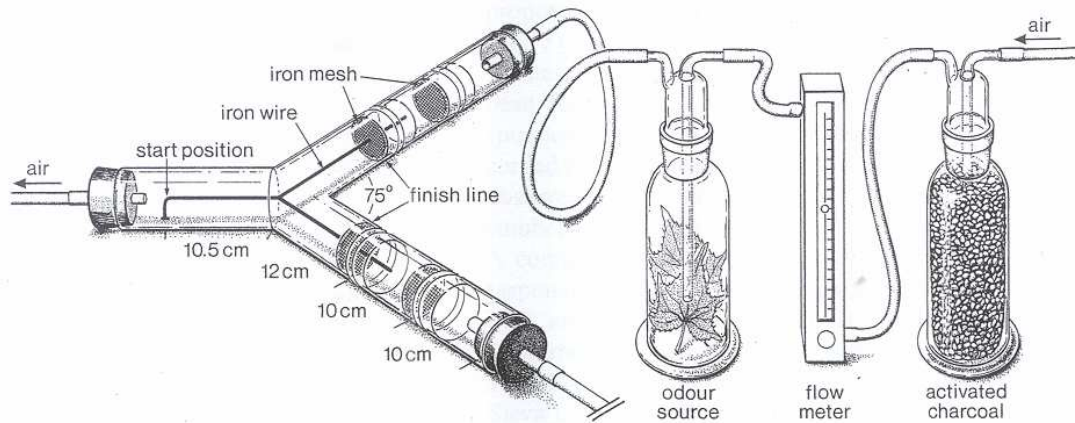


Fig. 2.2. Y-buis olfactometer (bron: Dicke *et al.*, 1990)

## 2.5. Experiment II

In dit experiment werd de aantrekkingskracht van roofmijten op verschillende transgene aardappelplantjes onderzocht. Hiervoor werden van 1 a 2 plantjes ( $\pm 7$ cm) per lijn de wortels gespoeld waarna ze in de potten van de olfactometer werden geplaatst. In de potten werd  $\pm 1$  cm water gegoten zodat de wortels niet uitdroogden. De roofmijten kregen de keus tussen de transgene aardappelplantjes en een wildtype van ongeveer dezelfde grootte. De experimenten zijn op verschillende dagen herhaald.

Tijdens de proeven zijn controleproeven gedaan. Dit werd gedaan door 9 bladeren van lima boon met en zonder spint aantasting als keus aan te bieden aan de roofmijten. De spintmijten zijn opgekweekt op lima boon in de kas van het entomologie gebouw in Wageningen. De controle proeven zijn gedaan op 4-4-2005, 12-4-2005, 11-5-2005 en 24-6-2005.

## 3. Resultaten

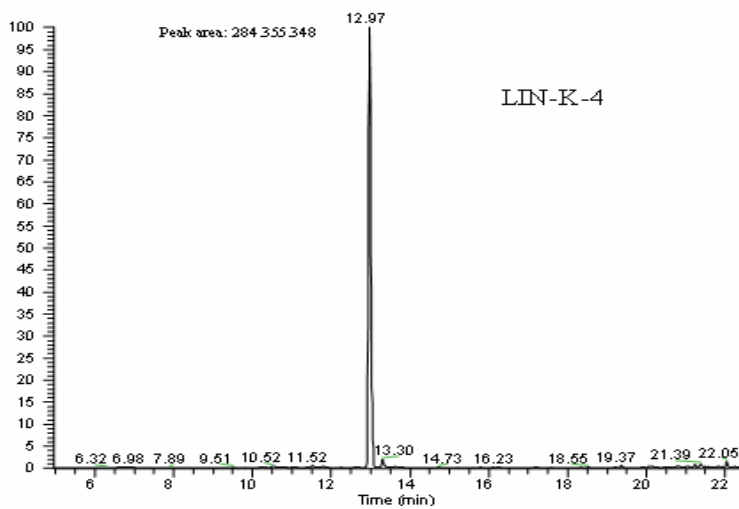
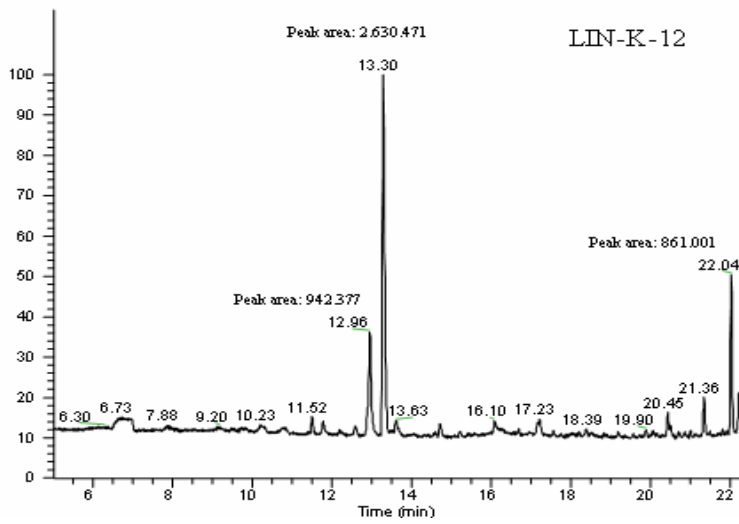
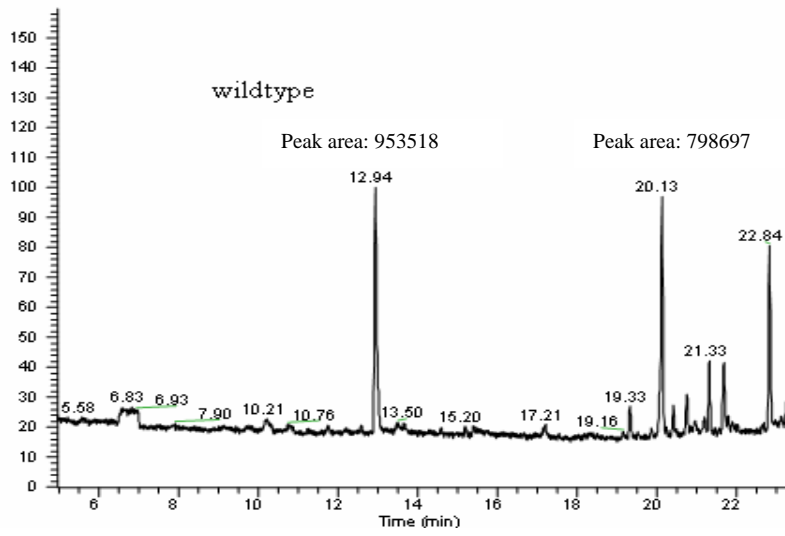
### 3.1. Algemeen

Met uitzondering van LIN-K-13 vertoonden de planten geen morfologische afwijkingen. Van LIN-K-13 waren alle bladeren lichter groen in vergelijking met de wildtypen en andere planten.

### 3.2. Geurkarakterisering

#### 3.2.1. Linalool planten: eerste analyse

In alle LIN planten zijn met behulp van de SPME GC-MS methode sporen van linalool gevonden, 2 weken nadat de planten in de kas werden gezet. In figuur 3.1 zijn gaschromatogrammen te zien van verschillende transgene en niet-transgene aardappelplanten. Op de X-as is de tijd te zien van het moment dat de geurcomponenten zich aan de GC-MS kolom hebben gehecht. Op de Y-as is het percentage te zien, waarbij de hoogste piek op 100% is gesteld. Bij de pieken staat het piekoppervlak zodat de grootte van pieken kunnen worden vergeleken. Bij de wildtypen is er bij 1 van de 3 planten een emissie van linalool aangetroffen. Het piekoppervlak is echter vele malen lager dan bij de LIN-planten. Tussen de verschillende lijnen was er een variatie in emissie van geurstoffen. De geurstoffen verschilden niet alleen in aanwezigheid maar ook in verhouding met elkaar. Zo zijn er bij enkele lijnen sporen gevonden van o.a. dimethyl nonatriene (in 6 van de 10 lijnen), ocimeen (9 lijnen) en nerolidol (8 lijnen). De planten van cultivar RJ hadden als hoogste piek linalool met uitzondering van LIN-RJ-8. Deze plant had als hoogste piek dimethyl nonatriene. Bij de planten van cultivar Kardal waren er 2 lijnen (LIN-K-9 en LIN-K-12) die als hoogste piek dimethyl nonatriene vertoonden. De andere lijnen hadden als hoogste piek linalool.



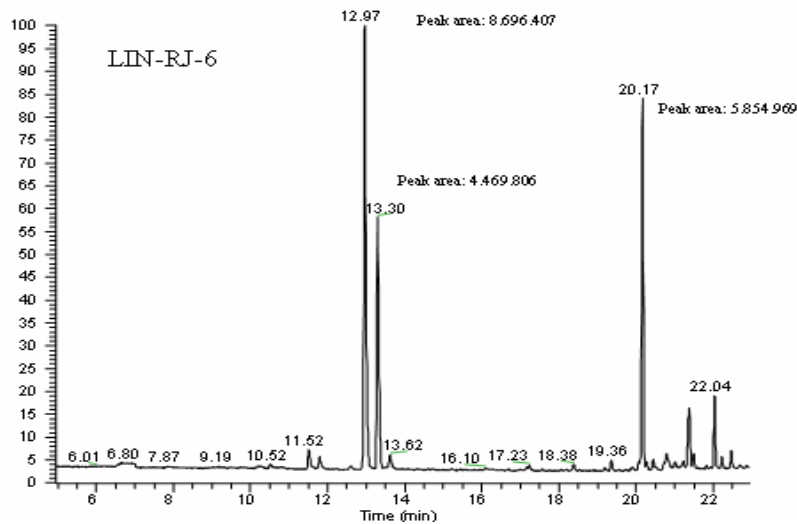


Fig. 3.1. GC patroon van een niet-transgene en transgene aardappelplanten waar het cDNA is ingebouwd dat codeert voor het enzym dat linalool aanmaakt. De resultaten zijn van 2 weken oude stekken. Pieken: 12.97, linalool; 13.30, dimethyl nonatriene 20.17, caryophylleen; 22.04, nerolidol.

Bij de endogene geurkarakterisering (5 weken nadat de planten in de kas werden gezet) werd bij alle LIN-planten linalool in het blad gevonden. Er was echter veel verschil tussen de aanwezigheid van linalool in het blad (Tabel 3.1). Zo verschilde het piekoppervlak bij de verschillende lijnen waarbij LIN-RJ-8 het grootste piekoppervlak had en LIN-K-16 de kleinste. In LIN-RJ-8 werd ongeveer 40 keer zoveel linalool aangetroffen als in LIN-K-16. Bij de wildtypen werd er geen linalool aangetroffen. Andere geurcomponenten die bij de meeste LIN-planten in grotere hoeveelheden zijn gevonden dan in de wildtypen zijn o.a. caryophylleen, nerolidol en decanal. Bij LIN-RJ-23 werd ongeveer 124 maal zoveel caryophylleen gevonden als in de wildtypen.

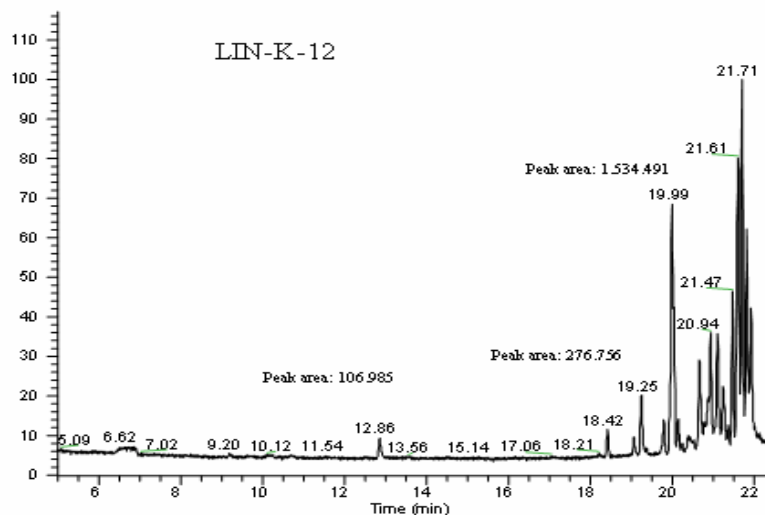
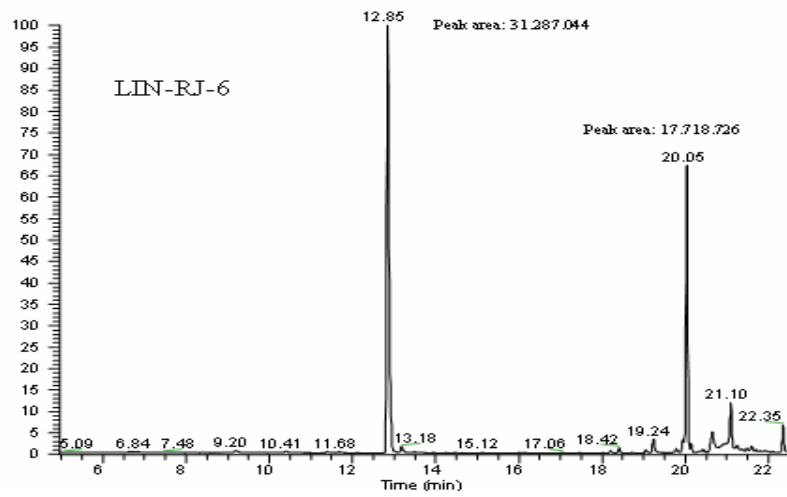
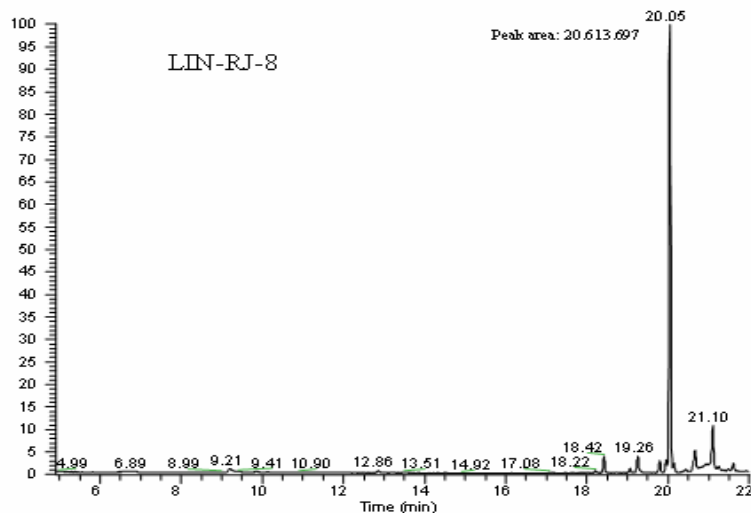
Tabel 3.1. Piekoppervlak van endogene geurstoffen per gram blad die zijn geanalyseerd met GC-MS. De planten die zijn gebruikt, zijn twee wildtypes en verschillende lijnen van transgene aardappelplanten waar het cDNA is ingebouwd dat codeert voor het enzym dat linalool aanmaakt. De resultaten zijn van stekken van 5 weken oude planten.

Plant	Linalool <sup>a</sup>	Caryophylleen <sup>a</sup>	Decanal <sup>a</sup>
LIN-RJ-6	292500	291200	101567
LIN-RJ-8	1029450	695600	0
LIN-RJ-13	245933	29600	0
LIN-RJ-23	492800	3100300	0
LIN-RJ-24	455520	249420	43920
LIN-K-4	285150	31600	0
LIN-K-12	154257	61271	40557
LIN-K-15	351283	0	10750
LIN-K-16	24675	0	0
Wild 1	0	14213	0
Wild 2	0	35625	0

<sup>a</sup> piekoppervlak

### 3.2.2. Linalool planten: tweede analyse

Bij de tweede analyse met de SPME GC-MS methode, anderhalve maand na de eerste, produceerden alle LIN-planten linalool in tegenstelling tot de wildtypen. Er zijn bij de verschillende analyses verschillende wildtypen gebruikt. Voor enkele lijnen was de verhouding van linalool ten opzichte van de andere geurcomponenten echter zeer klein zoals voor LIN-RJ-8 (Fig. 3.2). Er is echter geen direct verband te zien met de leeftijd van de planten en de verhouding linalool ten opzichte van andere heterologe (ingebrachte) geurcomponenten.



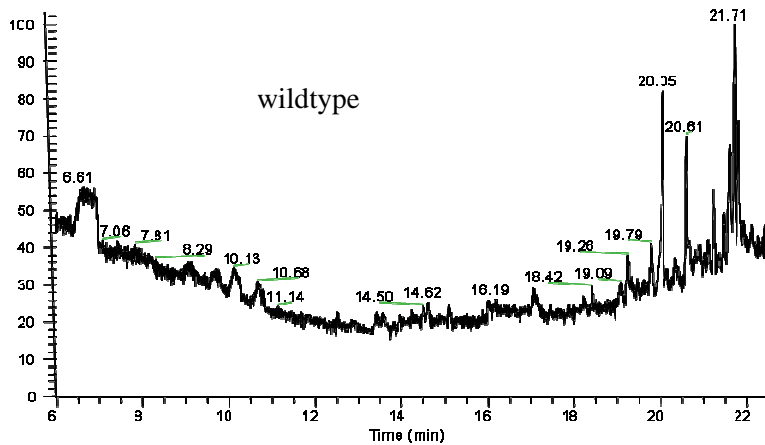


Fig. 3.2. GC patroon van een wildtype en transgene aardappelplanten waar het cDNA is ingebouwd dat codeert voor het enzym dat linalool aanmaakt. De resultaten zijn van stekken van 2 maanden oude planten. Pieken: 12.85, linalool; 13.30, dimethyl nonatriene 20.05, caryophylleen.

LIN-K-15 en LIN-K-16 produceerden net als de eerste keer geen dimethyl nonatriene (DMNT) (Tabel 3.2). LIN-RJ-8, LIN-K-12 en LIN-K-24 produceerden bij de tweede analyse wel DMNT in tegenstelling tot de eerste analyse. De eerste twee produceerden bij de tweede analyse meer DMNT dan linalool. Bij LIN-RJ-23 en LIN-K-9 was de verhouding linalool-DMNT bij de twee analyses omgedraaid waarbij de hoeveelheid linalool bij de eerste analyse kleiner was. LIN-K-4 en LIN-RJ-13 produceerden beide keren minder DMNT dan linalool.

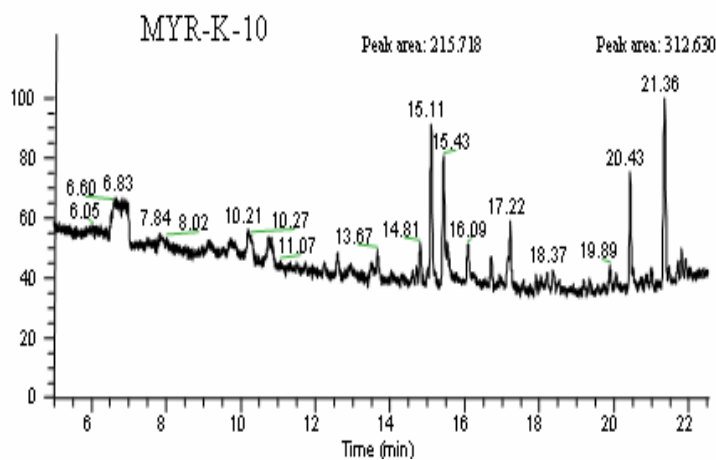
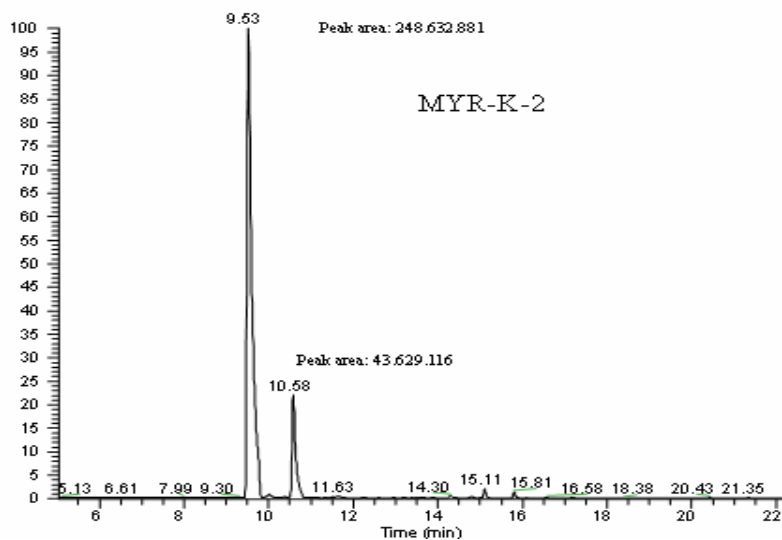
Tabel 3.2. Verhouding dimethyl nonatriene t.o.v. linalool, bij een wildtype en transgene aardappelplanten, geanalyseerd met de SPME GC-MS methode.

Plantlijn	dimethyl nonatriene t.o.v. linalool	
	1 <sup>st</sup> e analyse	2 <sup>de</sup> analyse
LIN-K-4	-	-
LIN-K-9	-	+
LIN-K-12	0	+
LIN-K-15	0	0
LIN-K-16	0	0
LIN-RJ-6	-	-
LIN-RJ-8	0	+
LIN-RJ-13	-	-
LIN-RJ-23	-	+
LIN-RJ-24	0	-
Wild	0	0

0 = geen, - = minder, + = meer.

### 3.2.3. Myrtenol planten

In bijna alle MYR-planten werd, 2 weken nadat de planten in de kas werden gezet,  $\alpha$ -pineen gevonden met behulp van de SPME-methode (Fig.3.3). Alleen MYR-K-9 produceerde op dat tijdstip geen  $\alpha$ -pineen. Bij de wildtypen is bij geen van de drie een emissie van  $\alpha$ -pineen gevonden. Naast  $\alpha$ -pineen produceerden de meeste MYR-lijnen (8 van de 14) ook  $\beta$ -pineen. De hoeveelheid  $\beta$ -pineen t.o.v.  $\alpha$ -pineen was voor de meeste lijnen  $\pm 20\%$  (5 lijnen). Voor de lijnen die een kleine hoeveelheid  $\alpha$ -pineen uitstootten (2 lijnen) was de hoeveelheid  $\beta$ -pineen t.o.v.  $\alpha$ -pineen  $\pm 40\%$ . Bij de wildtypen werd geen emissie van  $\beta$ -pineen gevonden. MYR-K-3, MYR-K-4 en MYR-K-10 produceerden naast  $\alpha$ -pineen ook myrtenol. MYR-K-4 produceerde tevens  $\beta$ -pineen.





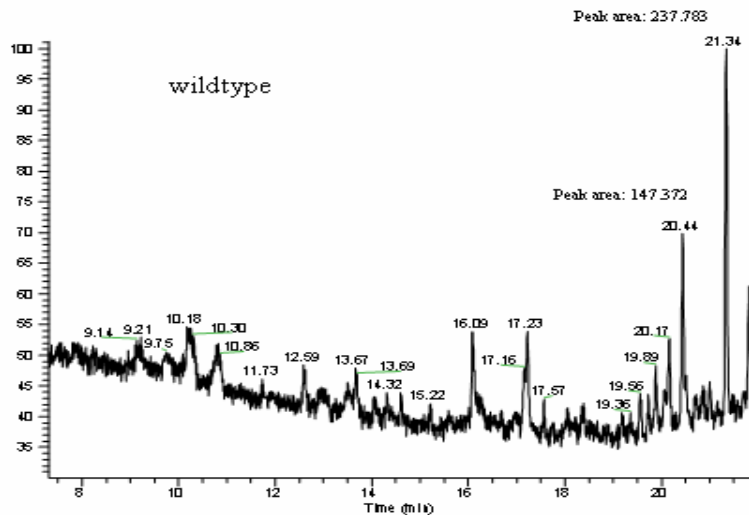


Fig. 3.3. GC patroon van transgene aardappelplanten waar de cDNA's zijn ingebouwd die coderen voor de enzymen die  $\alpha$ -pineen en myrtenol aanmaken. De resultaten zijn van stekken van 2 weken oude planten. Pieken: 9.53,  $\alpha$ -pineen; 10.58,  $\beta$ -pineen; 15.11, 3-pinanone; 15.43, myrtenol; 21.36, nophaleen.

Bij de endogene analyse werd er (5 weken nadat de planten in de kas werden gezet) in geen van de MYR-planten  $\alpha$ -pineen of  $\beta$ -pineen teruggevonden net als bij de wildtypen. Myrtenol is alleen in MYR-K-10 gevonden (Tabel. 3.3). Verder werden er geurstoffen teruggevonden in enkele MYR-planten die in het wildtype niet of in mindere mate voorkwamen zoals decanal,  $\beta$ -elemeen, humuleen, germacreen D en cadineen.

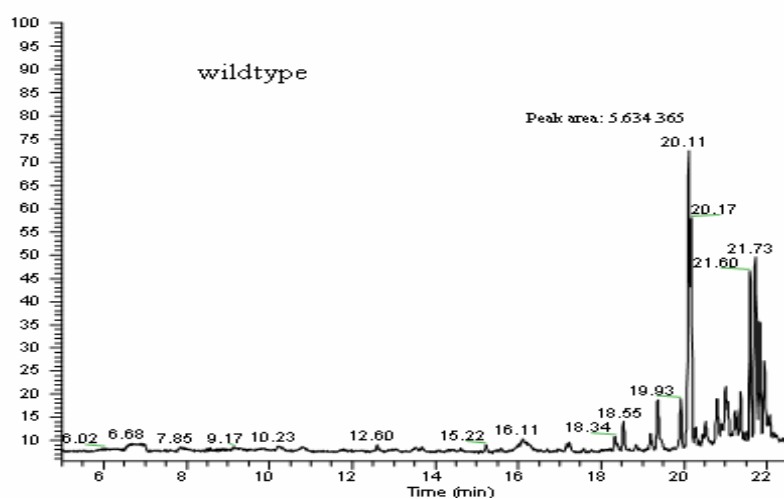
Tabel 3.3. Piekoppervlak van endogene geurstoffen per gram blad geanalyseerd met GC-MS. De planten die zijn gebruikt, zijn wildtypen en lijnen van transgene aardappelplanten waar de cDNA's zijn ingebouwd die coderen voor de enzymen die  $\alpha$ -pineen en myrtenol aanmaken. De resultaten zijn van stekken van 5 weken oude planten.

Plant	Decanal <sup>a</sup>	Myrtenol <sup>a</sup>	Humuleen <sup>a</sup>
MYR-K-3	43480	0	2234
MYR-K-4	0	0	0
MYR-K-9	0	0	0
MYR-K-10	0	19825	0
MYR-K-16	0	0	1454
MYR-K-21	0	0	0
MYR-RJ-1	11850	0	11143
MYR-RJ-7	0	0	0
MYR-RJ-12	0	0	0
MYR-RJ-13	0	0	0
MYR-RJ-15	0	0	0
Wild 1	0	0	0
Wild 2	0	0	6722

<sup>a</sup> Piekoppervlak

### 3.2.4. Dubbel construct planten

Met uitzondering van DC-K-9 werd in alle planten  $\alpha$ -pineen gevonden met behulp van de SPME methode, twee weken nadat de planten in de kas werden gezet (Fig. 3.4). In 4 van de 8 planten werd tevens  $\beta$ -pineen teruggevonden. Alleen in de plant DC-RJ-10 werd myrtenol teruggevonden. De wildtypen produceerden geen  $\alpha$ -pineen of myrtenol. Naast deze stoffen produceerden de meeste lijnen L-lysine (4 van de 8) en berbanol (4 van de 8).



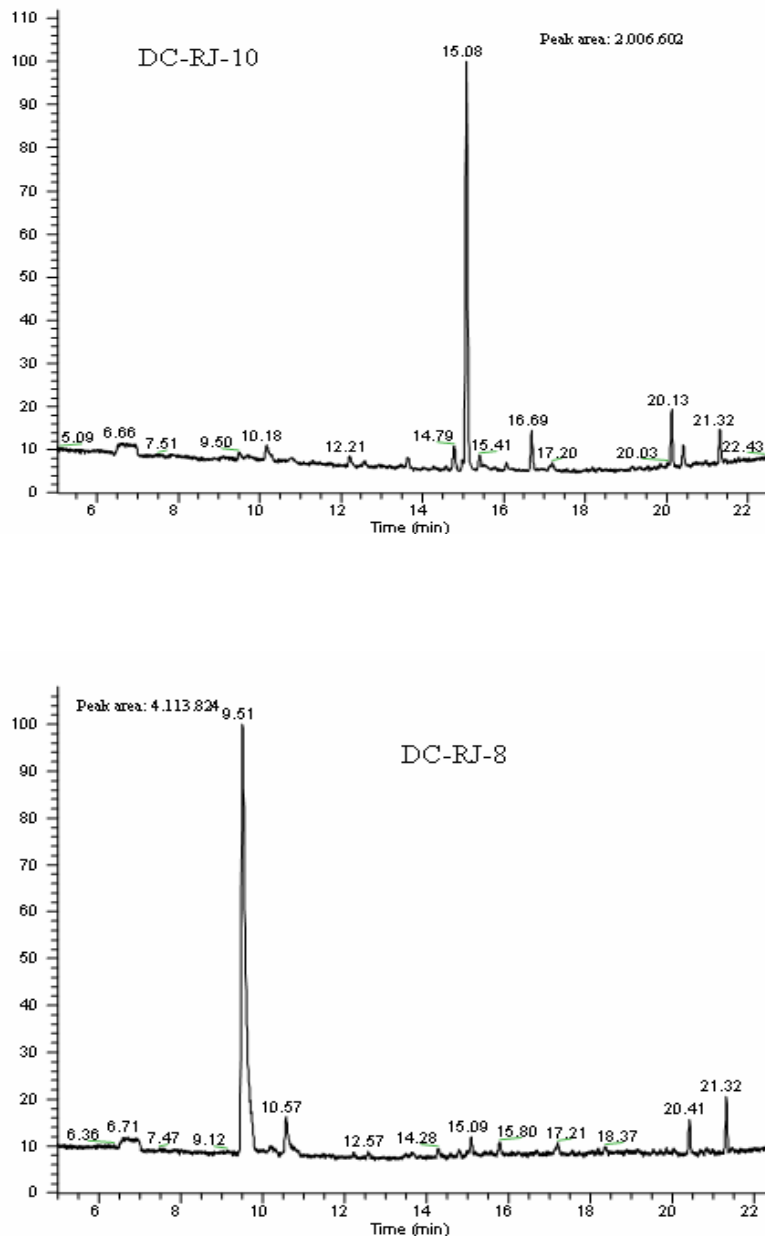


Fig. 3.4. GC patroon van transgene aardappelplanten waar de cDNA's zijn ingebouwd die coderen voor de enzymen die  $\alpha$ -pineen en myrtenol aanmaken. Pieken: 9.51,  $\alpha$ -pineen; 10.57,  $\beta$ -pineen; 15.08, 3-pinanone; 15.41, myrtenol; 20.13, caryophylleen.

Bij de endogene analyse (5 weken nadat de planten in de kas werden gezet) werd bij geen van de DC-planten myrtenol aangetroffen.  $\alpha$ -pineen werd in twee DC-planten gevonden. Bij geen van de wildtypen werd  $\alpha$ -pineen of myrtenol teruggevonden. De planten van de cultivar Kardal produceerden allemaal  $\beta$ -elemeen,  $\beta$ -farneseen, humuleen germacreen D, epizonareen en muuroleen.

Tabel 3.4. Piekoppervlak van endogene geurstoffen per gram blad geanalyseerd met GC-MS. De planten die zijn gebruikt zijn wildtypen en verschillende lijnen van transgene aardappelplanten waar de cDNA's zijn ingebouwd die coderen voor de enzymen die  $\alpha$ -pineen en myrtenol aanmaken. De resultaten zijn van stekken van 5 weken oude planten.

Plant	$\beta$ -elemeen <sup>a</sup>	Myrtenol <sup>a</sup>	$\alpha$ -pineen <sup>a</sup>	$\beta$ -farneseen <sup>a</sup>
DC-K-1	384467	0	30533	384467
DC-K-5	203400	0	33100	203400
DC-K-7	781329	0	0	781329
DC-K-9	130125	0	0	130125
DC-RJ-10	0	0	0	35167
DC-RJ-16	102333	0	0	0
Wild 1	0	0	0	81250
Wild 2	18975	0	0	18975

<sup>a</sup> Piekoppervlak

### 3.3. PCA (Principal Component Analysis)

Een tweedimensionale PCA-plot laat de verschillen zien tussen de aardappelplanten m.b.t. emissie van geuren (Fig. 3.5) en geurstoffen aanwezig in het blad (Fig. 3.6). Bij de PCA die verkregen is van de headspace data werden de verschillen voor 17.8% verklaard door het eerste component. Voor deze component (X-as) is er een duidelijk verschil te zien tussen de LIN-planten en de MYR- en DC-planten. Vooral LIN-RJ verschilt duidelijk van de andere groepen. Ook is te zien dat de verschillende transgene lijnen van DC-RJ dicht bij elkaar gegroepeerd liggen. De verschillen worden voor 8% verklaard door het tweede component. Voor deze component (Y-as) is het verschil minder duidelijk. Alleen LIN-RJ en DC-RJ liggen op verschillende plekken van de Y-as.

Bij de PCA van de endogene data werden de verschillen voor 11.3% verklaard door het eerste component. Voor deze component (X-as) is geen duidelijk verschil te zien tussen de groepen. De meeste lijnen van DC-K liggen gegroepeerd ver van DC-RJ en het wildtype. Één lijn van DC-K ligt echter juist dicht bij deze groepen. Het verschil tussen de lijnen werd voor 7.8% verklaard door het tweede component. Deze component (Y-as) laat duidelijk zien dat de DC-planten verschillen van LIN en MYR-RJ. Er is dus een duidelijk onderscheid tussen deze groepen. Een duidelijk verschil tussen de wildtypen en de andere groepen is niet te zien. In de figuren 3.7 en 3.8 zijn delen van het dendogram te zien die bij de PCA van de endogene analyse hoort. Hierin is duidelijk te zien dat de LIN-planten een hoge emissie vertonen van linalool en dimethyl nonatriene terwijl de andere planten deze stof niet of in mindere mate produceerden.

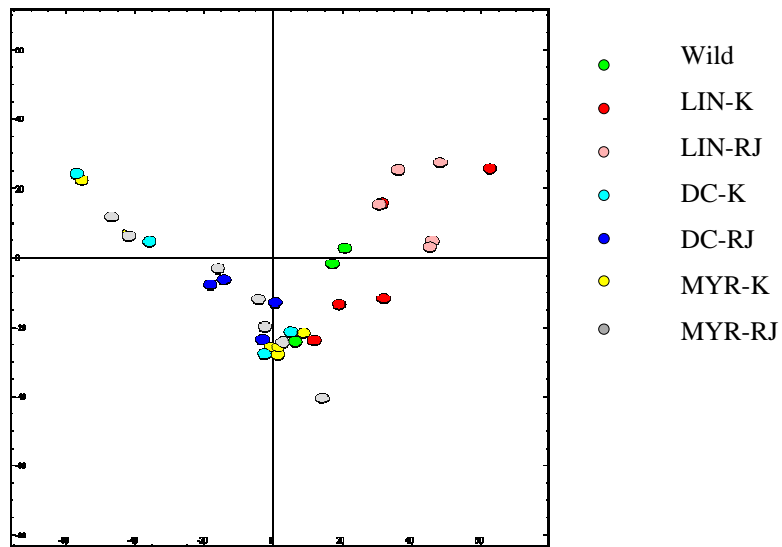


Fig. 3.5. PCA-plot van de productie van geurcomponenten van verschillende wilde en transgene aardappellijnen, 2 weken nadat de planten in de kas werden gezet. De data zijn verkregen van de resultaten van de headspace analyse. Wanneer de afstand tussen punten groter is, verschillen de plantlijnen meer van elkaar.

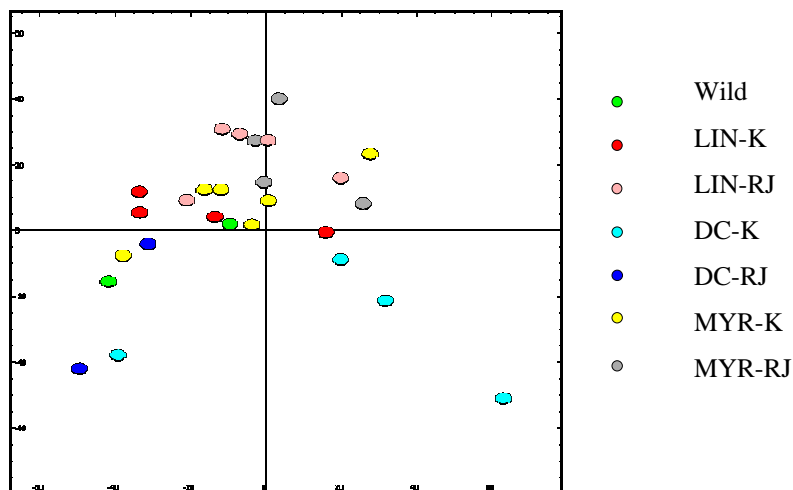


Fig. 3.6. PCA-plot van de productie van geurcomponenten van verschillende wilde en transgene aardappellijnen, 5 weken nadat de planten in de kas werden gezet. De data zijn verkregen van de resultaten van de endogene analyse. Wanneer de afstand tussen punten groter is, verschillen de plantlijnen meer van elkaar.



### 3.4. Gedragsonderzoek

#### 3.4.1. Aantrekkingskracht van verschillende concentraties linalool op roofmijten

Er zijn drie concentraties linalool getest namelijk 2 $\mu$ g, 0.2 $\mu$ g en 0.02 $\mu$ g. Bij geen van de concentraties was er een significant verschil voor de aantrekkingskracht op roofmijten (Fig. 3.9). Bij concentraties van 2 $\mu$ g en 0.2 $\mu$ g hadden de roofmijten een lichte voorkeur voor linalool. Dit was echter niet significant.

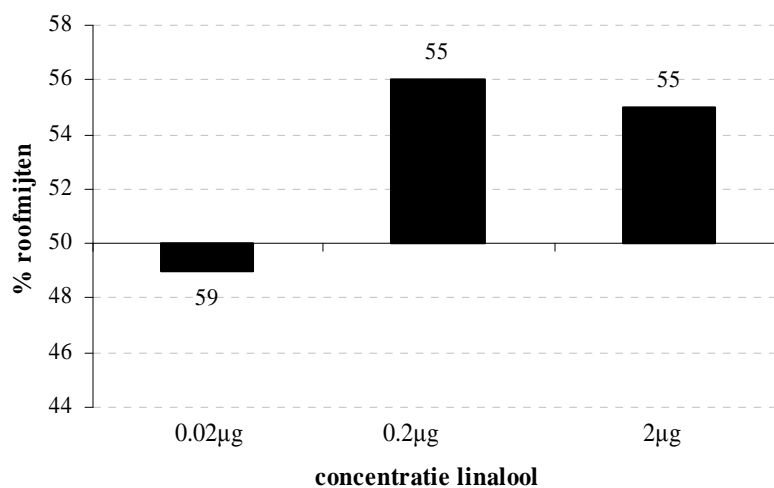


Fig. 3.9. Effect van verschillende concentraties synthetische linalool op het gedrag van roofmijten getest in een Y-buis olfactometer. De getallen boven en onder de kolomen geven aan hoeveel roofmijten zijn getest.

#### 3.4.2. Aantrekkingskracht van transgene aardappelplanten op roofmijten

Bij deze Y-buis proeven zijn de lijnen LIN-K-4, LIN-K-15, LIN-K-9, LIN-RJ-23 en LIN-RJ-24 gebruikt. Alleen voor LIN-K-4 kwamen er significante verschillen ( $\alpha = 0.05$ ) naar voren (Fig. 3.10). Van de 117 geteste roofmijten gaven 70 roofmijten de voorkeur aan LIN-K-4. Voor de andere planten gold dat het percentage roofmijten dat een voorkeur had voor de transgene aardappelplanten tussen de 52 en 57 lag. Alleen bij LIN-RJ-23 hadden de roofmijten een voorkeur voor de controle planten met 62%.

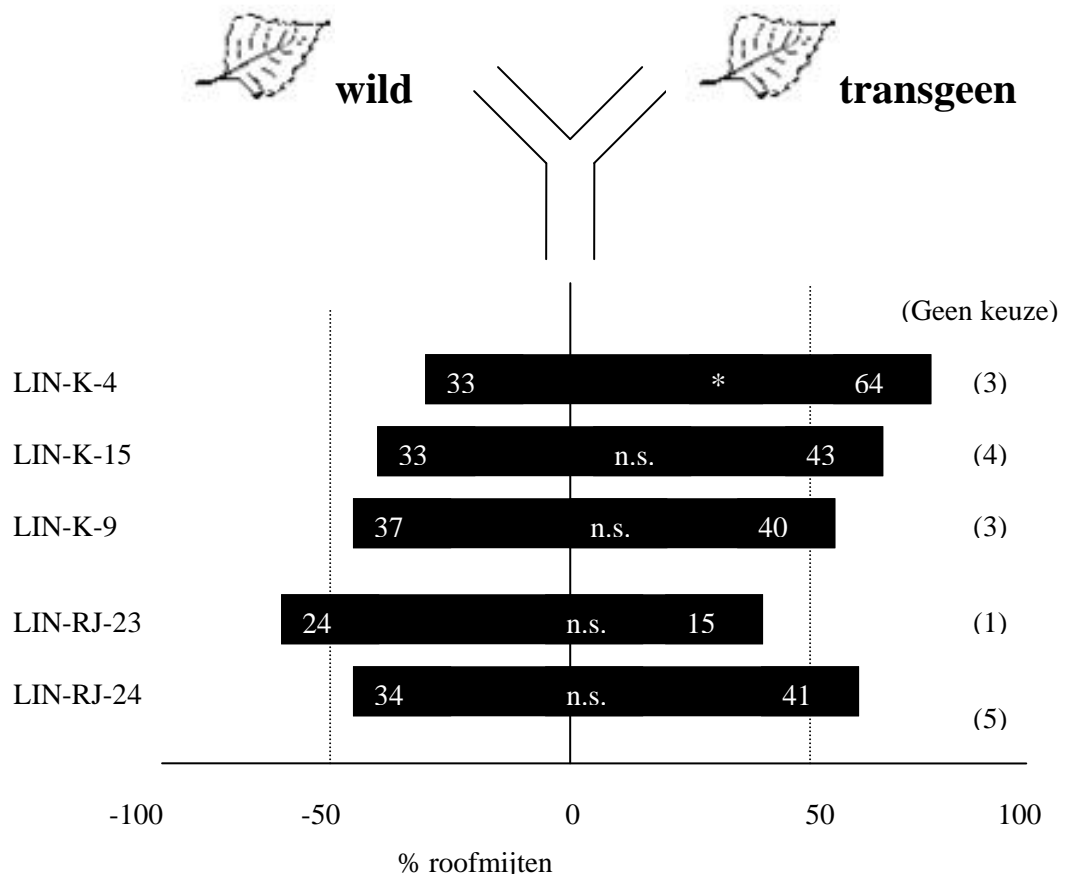


Fig. 3.10. Effect van linalool producerende transgene aardappelplanten op de aantrekkingskracht van roofmijten. \*  $0.01 < P < 0.05$ .



## 4. Discussie

### 4.1. Algemeen

De transgene planten en wildtypen (controle) zijn allemaal in een kascompartiment onder dezelfde omstandigheden opgekweekt. Het enige verschil is dat de transgene planten eerst *in vitro* zijn opgekweekt en daarna afgehard. De wildtypen die zijn gebruikt waren stekken van planten die al in de kas stonden. Hierdoor zagen de transgene planten er zwakker uit dan de controle planten. In tegenstelling tot eerder onderzoek (Aharoni en Jongtsma, ongepubliceerd) had het merendeel van de transgene planten geen morfologische afwijkingen. Op één uitzondering na (LIN-K-13) had geen van de planten last van onderontwikkeling of andere morfologische afwijkingen in vergelijking met de wildtypen. Van enkele planten zoals LIN-K-4 was een duidelijke productie van linalool te ruiken.

### 4.2. Karakterisatie van geurcomponenten

Door middel van de headspace analyse zijn ongeveer 15 geurcomponenten geïdentificeerd per lijn (Bijlage I). Bij de endogene analyse zijn er meer dan 10 per lijn geïdentificeerd (Bijlage II). De componenten die zijn gevonden zijn niet in beide analyses hetzelfde. Het verschil in resultaten tussen de endogene analyse en de headspace analyse kan zijn ontstaan doordat sommige stoffen die worden aangemaakt een toxische werking hebben, waardoor de plant deze stoffen zo snel mogelijk zal proberen af te scheiden. Deze stoffen zullen dan niet of nauwelijks in het blad aanwezig zijn. Andere stoffen blijven juist in de plant doordat de plant deze niet kan afscheiden of omdat ze worden omgezet in andere stoffen.

#### 4.2.1. LIN-planten

Het inbouwen van cDNA dat codeert voor het enzym dat linalool aanmaakt heeft ervoor gezorgd dat de planten ook werkelijk linalool produceerden en uitstoten. Aharoni *et al.* (ongepubliceerd) en Aharoni *et al.* (2003) vonden ook linalool terug in respectievelijk aardappelplanten en arabidopsis waar aardbei linalool synthase was ingebouwd. Lücker *et al.* (2001) vond alleen linalool terug in de bloemen en niet in de vegetatieve delen van petunia planten waar linalool synthase was ingebouwd. Net als in dit onderzoek zijn in transgene arabidopsis planten zowel linalool in het blad als gasvormig linalool gevonden (Aharoni *et al.*, 2003). Tussen de lijnen is een groot verschil in linalool productie. Dit verschil komt waarschijnlijk door de genetische variatie tussen de lijnen, aangezien er geen verschil is in omgevingsfactoren. Naarmate planten meer op elkaar lijken zal de uitstoot van

geurcomponenten van deze planten ook meer op elkaar lijken. Er zijn dan ook geen duidelijke cultivarverschillen gevonden in uitstoot (headspace) van linalool of andere geurcomponenten.

De verhoudingen van linalool t.o.v. andere geurcomponenten verschilden per tijdstip. Bij de eerste analyse maakten alle lijnen geen of minder dimethyl nonatriene aan in vergelijking met linalool, terwijl bij de tweede analyse door vier lijnen meer dimethyl nonatriene dan linalool werd aangemaakt. Hoewel er geen relatie te zien was tussen de productie van geurstoffen en de leeftijd van de plant is het niet uitgesloten dat hier toch een relatie tussen bestaat. Er zijn namelijk vele andere factoren die verschillen per meting zoals tijdstip van de dag, aantal dagen/ uren na stekken, lichtintensiteit, leeftijd bladeren etc. De meeste LIN-planten vertoonden naast de uitstoot van linalool en dimethyl nonatriene ook een uitstoot van nerolidol, allo-ocimeen, en (*E*)-ocimeen. Aangezien geen van de wildtypen deze componenten produceerden is de productie van deze stoffen waarschijnlijk het gevolg van het genetisch modificeren van de aardappelplanten.

#### 4.2.2. MYR-planten

Het inbouwen van cDNA dat codeert voor  $\alpha$ -pineen synthase heeft bij bijna alle MYR-planten geleid tot een emissie van  $\alpha$ -pineen. Enkele lijnen hadden ook een emissie van myrtenol. Het inbouwen van cDNA dat codeert voor het enzym P450 heeft dus, bij enkele lijnen, gezorgd voor een omzetting van  $\alpha$ -pineen in myrtenol. De lijnen die myrtenol produceerden waren allemaal planten van de cultivar Kardal.

Bij de endogene analyse werd geen  $\alpha$ -pineen aangetroffen wat erop wijst dat de planten deze stof na productie snel weer uitstoten. Hetzelfde geldt voor  $\beta$ -pineen. Myrtenol is bij de endogene analyse maar in één lijn teruggevonden terwijl deze bij de headspace analyse in drie lijnen is teruggevonden. Dit kan erop wijzen dat ook myrtenol een stof is die de plant liever uitstoot of dat het transformeren niet optimaal is verlopen. Het op deze manier modificeren van aardappelplanten heeft geleid tot de productie van o.a. decanal, humuleen en cadineen.

#### 4.2.3. DC-planten

Wanneer de aardappelplanten d.m.v. een dubbel construct worden gemodificeerd (DC) heeft dit voor de uitstoot van  $\alpha$ -pineen hetzelfde effect als bij de MYR-planten. Voor myrtenol heeft deze manier van genetische modificatie ook effect maar bij minder lijnen. Wat opvalt, is dat bij de DC-planten er alleen een emissie van myrtenol was bij de cultivar RJ, in tegenstelling tot de MYR-planten waarbij er alleen een emissie van myrtenol was bij de cultivar Kardal. Cultivars schijnen dus verschillend te reageren wanneer men myrtenol op

verschillende manieren (MYR of DC) probeert te verkrijgen d.m.v. genetische modificatie. De DC-planten vertoonden een andere uitstoot van geurstoffen dan de MYR-planten. Er was bij deze planten een emissie van L-lysine en berbanol welke niet bij de MYR-planten werd gevonden.

Bij de endogene analyse werd er bij de DC-planten in tegenstelling tot de MYR-planten wel  $\alpha$ -pineen gevonden in enkele lijnen. Deze lijnen waren beide van de cultivar Kardal. De cultivar RJ stoot  $\alpha$ -pineen waarschijnlijk sneller uit. De lijnen waarbij  $\alpha$ -pineen in het blad werd teruggevonden, vertoonden in de headspace analyse wel een uitstoot van  $\alpha$ -pineen maar niet van myrtenol. Dit geeft aan dat  $\alpha$ -pineen niet is omgezet in myrtenol en dus heeft het enzym P450 bij deze twee lijnen niet gewerkt. Voor de lijn DC-RJ-10 die wel myrtenol aanmaakte werd er wel  $\alpha$ -pineen in de headspace gevonden maar het werd niet in het blad gevonden wat wil zeggen dat een gedeelte van  $\alpha$ -pineen werd omgezet in myrtenol en de rest werd uitgestoten. De meeste DC-planten produceerden  $\beta$ -elemeen,  $\beta$ -farneseen, humuleen, Germacreen D, epizonareen en muuroleen.

### 4.3. PCA

Om een indruk te krijgen welke geurstoffen verantwoordelijk zijn voor de verschillen tussen verschillende groepen planten (LIN, MYR, DC) is gebruik gemaakt van Principal Component Analysis (PCA). Vooral de PCA gemaakt van de headspace data is te zien dat de planten van LIN-RJ dicht bij elkaar liggen. Als we de MYR en de DC-planten vergelijken met de LIN-planten zien we dat deze aparte groepen vormen. Met de uitzondering van 1 lijn zien we dat de MYR-K-planten ook een grote overeenkomst hebben. Het eerste component uit de PCA staat waarschijnlijk voor het op verschillende manieren genetisch modificeren van de planten. Dit heeft ertoe geleid dat de planten aparte groepen vormen met overeenkomsten binnen de groepen. Twee van de drie wildtypen liggen dicht bij elkaar. De derde ligt er echter een stuk vandaan. Dit was ook te zien in de resultaten. Dit wildtype gaf een emissie van stoffen die de transgene planten ook uitstootten in tegenstelling tot de andere wildtypen. Deze stoffen waren  $\beta$ -pineen, linalool en copaeen. Uit het dendrogram komt naar voren dat de verschillen tussen de LIN-planten en de andere planten waarschijnlijk komt door de uitstoot van linalool en dimethyl nonatriene.

Bij de data van de endogene analyse is het verschil tussen de groepen minder goed te zien. Duidelijk is wel dat de DC-planten aan de onderkant gegroepeerd liggen. Ze hebben echter weinig gemeen met de MYR-planten. Het inbrengen van twee genen op verschillende manieren, zoals bij de MYR- en de DC-planten is gedaan, leidt dus tot een duidelijk verschil in geurcomponenten zoals de PCA laat zien. Ook bij de wildtypen zien we dat deze ver uit elkaar liggen wat ook in de resultaten van de endogene geurkarakterisatie naar voren kwam.

Hierin kwam naar voren dat één van de twee wildtypen een aantal geurstoffen in hoge mate produceerde die de andere groepen (LIN, MYR, DC) ook produceerden.

#### 4.4. Gedragsonderzoek

##### 4.4.1. Aantrekkingskracht van verschillende concentraties linalool op roofmijten

In tegenstelling tot wat Dicke *et al.* (1990) vond waren de concentraties synthetische linalool die zijn getest niet significant aantrekkelijk voor roofmijten. Er was echter wel een lichte voorkeur te zien voor de linalool wanneer deze bij 2µg en 0.2µg werden getest. Het aantal testen die gedaan zijn, is misschien te klein om een verschil aan te tonen. Wanneer het aantal testen groter is, bestaat de kans dat er wel degelijk een significante voorkeur is voor de concentraties linalool. Een andere verklaring voor het gebrek aan aantrekkingskracht, is dat linalool zich wellicht heeft gehecht aan de metalen draad van de Y-buis waardoor er geen duidelijk verschil ontstond tussen de armen van de Y-buis. Het kan ook zijn dat de metalen draad vervuild was met andere stoffen waardoor de geur van linalool gemaskeerd werd. Na een analyse van de metalen draad met de GC-MS werd er geen linalool gevonden maar wel een hoop verschillende oliën. Deze stoffen zouden invloed kunnen hebben gehad op het gedrag van de roofmijten.

##### 4.4.2. Aantrekkingskracht van transgene aardappelplanten op roofmijten

LIN-K-4 was de enige plantlijn die een significante positieve aantrekkingskracht had op roofmijten. Op de tijdstippen, dat er een headspace werd genomen was linalool bij LIN-K-4 de hoogste piek. Het piekoppervlak van linalool was bij de eerste (284.355.348) en tweede (142.129.662) headspace analyse hoger dan de andere lijnen. Voor andere lijnen verschilden de percentages roofmijten die zich tot linalool aangetrokken voelden per test (20 roofmijten) aanzienlijk. Bij sommige testen koos 80% van de roofmijten de richting van linalool terwijl bij dezelfde plant in een tweede test een percentage van 30 voor de richting van linalool koos. Verschillende testen met dezelfde planten gaven dus niet altijd dezelfde uitkomst. Dit komt waarschijnlijk doordat de planten in leeftijd verschilden aangezien het tijdstip (verschillende dagen) waarop de verschillende testen werden gedaan van elkaar verschilden. Hierdoor was de emissie van linalool verschillend. Uit de resultaten van de karakterisering van de planten kwam ook naar voren dat de emissie van geurstoffen verschilden op verschillende tijdstippen. Het is dus zeer waarschijnlijk dat de planten bij de verschillende testen een verschil vertonen in de emissie van geurstoffen. Doordat roofmijten bij verschillende concentraties linalool verschillend reageren (Dicke *et al.*, 1990), is het waarschijnlijk dat hierdoor het verschil in

resultaat is ontstaan wanneer dezelfde plant werd getest op verschillende momenten. Een andere factor die een rol kan spelen bij het verschil in emissie van geurstoffen is stress. Doordat de wortels van de planten werden gespoeld kan het zijn dat de planten onder stress stonden en dit de emissie van geurstoffen heeft beïnvloed. Het is erg belangrijk te weten welke hoeveelheid linalool door de plant wordt uitgestoten op het moment van testen.

## 5. Conclusie en aanbevelingen

### 5.1. Conclusie

Uit dit onderzoek komt naar voren dat het inbrengen van cDNA die codeert voor linalool synthase of  $\alpha$ -pineen synthase voor de meeste aardappellijnen leidt tot een uitstoot van respectievelijk linalool en  $\alpha$ -pineen. Het op verschillende manieren inbrengen van een enzym dat  $\alpha$ -pineen omzet in myrtenol werkt voor de twee cultivars verschillend. De cultivar Kardal kan myrtenol aanmaken als het cDNA dat zorgt voor  $\alpha$ -pineen synthase en het cDNA van P450, apart van elkaar worden ingebracht. Dit in tegenstelling tot de cultivar RJ die myrtenol aan kan maken als de twee cDNA's d.m.v. een dubbelconstruct zijn ingebracht.

Naast linalool produceren de LIN-planten vooral dimethyl nonatriene, caryophylleen en nerolidol en vertonen ook emissie van deze stoffen. De MYR-planten en DC-planten vertonen een emissie van  $\alpha$ -pineen. Deze stof wordt na aanmaak snel weer uitgestoten door de plant en wordt hierdoor nauwelijks teruggevonden in het blad. Hiernaast vertonen de meeste MYR-planten en DC-planten een emissie van  $\beta$ -pineen. De MYR-planten produceren voornamelijk decanal, humuleen en cadineen, maar deze stoffen worden niet uitgestoten. De DC-planten produceren voornamelijk  $\beta$ -elemeen,  $\beta$ -farneseen, humuleen, germacreen D, epizonareen en muuroleen. Ook van deze stoffen vond er geen emissie plaats.

Voor onderzoek naar het gedrag van roofmijten op linalool producerende planten is het erg belangrijk te weten welke hoeveelheid linalool de plant op het moment van testen uitstoot. Van de transgene planten die linalool produceerden had alleen LIN-K-4 een significante positieve aantrekkingskracht op roofmijten.

### 5.2. Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

Wanneer planten onder lichte stress staan zal dit zich uitdrukken in een verandering in uitstoot van geurcomponenten. Dit kan zowel kwalitatief als kwantitatief verschillen. Om een goed beeld te krijgen van de invloed van tijd op de uitstoot van geurcomponenten zal er onderzoek gedaan moeten worden waarbij de tijd als enige factor verschilt. Dit kan worden gedaan door de planten in een klimaatcel op te laten groeien en om de twee uur de uitstoot van geurcomponenten te analyseren d.m.v. een headspace. Wanneer er geen of nauwelijks verschillen zijn in uitstoot van geurcomponenten kan men andere factoren testen zoals de invloed van licht, temperatuur, beschadiging, droogtestress etc. Maar niet alleen verschil in tijdstip per dag moet onderzocht worden. De productie en uitstoot door de groeiperiode heen zal waarschijnlijk verschillen. Aharoni *et al.* (2003) vond een herhaald patroon in de uitstoot van linalool bij transgene arabidopsis planten. Om te achterhalen of dit ook het geval is bij de

transgene aardappelplanten zal de uitstoot moeten worden geanalyseerd vanaf het moment van stekken tot aan het moment dat de plant volwassen is. Hiernaast is het interessant te weten wat de productie van linalool is wanneer de planten zijn aangetast door spint.

Voor het gedragswerk is het belangrijk te weten hoeveel linalool de plant precies uitstoot op het moment van testen. In de Y-buis zal een headspace analyse moeten plaatsvinden. Het nadeel is echter dat voor een goede headspace analyse een bepaalde tijd gemonsterd moet worden. Wanneer men dit wil doen door de geurstoffen op te vangen d.m.v. een tenax-bemonstering zal er 24 uur moeten worden gemonsterd. Dit zal niet representatief zijn voor de hoeveelheid emissie op het moment van testen aangezien de emissie door de dag heen waarschijnlijk verschilt. De SPME-methode (handmatig) kan echter wel werken voor een indicatie van de verhouding geurstoffen t.o.v. elkaar.

Een ander punt dat onderzocht moet worden is de aantrekkingskracht van roofmijten op de transgene aardappelplanten wanneer deze zijn aangetast door spint. Het zou kunnen dat de emissie van linalool te groot is waardoor de roofmijten de planten afstotelijk vinden. Hiernaast zal het gedrag van roofmijten onderzocht moeten worden wanneer deze zijn gekweekt op de transgene aardappelplanten. Wanneer de roofmijten de geur van de transgene aardappelplanten kunnen linken aan spint zal de roofmijt een voorkeur hebben voor deze aardappelplanten.

Linalool is binnen de biologische bestrijding niet alleen interessant doordat deze een lokkende werking heeft op roofmijten. Aharoni *et al.* (2003) toonde in zijn experiment aan dat transgene, linalool producerende arabidopsis planten een afstotelijke werking hadden op het gedrag van luizen (*Myzus persicae*). Wellicht is het interessant om te onderzoeken welke invloed de transgene aardappelplanten hebben op het gedrag van *M. persicae*.

---

## Referenties

Aharoni, A., Giri, A.P., Deuerlein, S., Griespink, F., de Kogel, W., Verstappen, F.W.A., Verhoeven, H.A., Jongasma, M.A., Schwab, W., Bouwmeester, H.J., 2003. **Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants.** *The plant cell* 15: 2866-2884.

Anoniem, 2005. <http://207.5.71.37/biobest/nl/producten/nuttig/phytoseiulus.htm>, april 2005.

Bouwmeester, H.J., Verstappen, F.W.A., Aharoni, A., Lückner, J., Jongasma, M.A., Kappers, I., Luckerhoff, L.L.P., Dicke, M., 2003. **Exploring multi-trophic plant-herbivore interactions for new crop protection methods.** *Proceedings of the BCPC International Congress Crop Science & Technology* 2: 1123-1134.

Chénier, J.V.R. en Philogéne, B.J.R., 1989. **Field responses of certain forest coleopteran to conifer monoterpenes and ethanol.** *Journal of Chemical Ecology* 15: 1729-1745.

Choh, Y., Shimoda, T., Ozawa, R., Dicke, M., Takbayashi, J., 2004. **Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants result in emission of carnivore attractants: active or passive process?** *Journal of Chemical Ecology* 7: 1305-1317.

De Boer, G.J., Dicke, M., 2004. **Experience with methyl salicylate affects behavioral responses of a predatory mite to blends of herbivore-induced plant volatiles.** *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110: 181-189.

De Moraes, C.M., Lewis, W.L., Paré, P.W., Alborn, H.T., Tumlinson, J.H., 1998. **Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids.** *Nature* 393: 570-573.

Dicke, M., 1999. **Evolution of induced indirect defence of plants.** In: Tollrian, R. and Harvell, C.D.(eds.), *The ecology and evolution of inducible defences.* Princeton University Press, 62-88.

Dicke, M., 2005. **Hoe planten insecten herkennen: van 'spitting image' tot voetstapherkenning.** *Kennislink i.s.m. Expertise Centrum Biologie (NIBI).*  
[www.kennislink.nl/web/show](http://www.kennislink.nl/web/show)



- Dicke, M., De Boer, J.G., Höfte, M., Rocha-Granados, M.C., 2003. **Mixed blends of herbivore-induced plant volatiles and foraging success of carnivorous arthropods.** *OIKOS* 101:38-48.
- Dicke, M., Ludeking, D., Posthumus, M.A., 1999. **Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatile in lima bean plants.** *Journal of Chemical Ecology* 25: 1907-1922.
- Dicke, M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., Dom, M.A., Van Bokhoven, H., De Groot, A.E., 1990. **Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions: Involvement of host plant in its production.** *Journal of Chemical Ecology* 16: 381-396.
- Gols, R., Roosjen, M., Dijkman, H., Dicke, M., 2003. **Induction of direct and indirect plant responses by jasmonic acid, low spider mite densities, or a combination of jasmonic acid treatment and spider mite infestation.** *Journal of Chemical Ecology* 29: 2651-2666.
- Gouinguéné, S., Degen, T., Turlings, T.C., 2001. **Variability in herbivore-induced odor emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte).** *Chemoecology* 11: 9-16.
- Han, B., Chen, Z., 2002. **Behavioral and electrophysiological responses of natural enemies to synomones from tea shoots and kairomones from tea aphids, *Toxoptera aurantii*.** *Journal of Chemical Ecology* 28: 2203-2219.
- Loughrin, J.H., Manukian, A., Heath, R.R., Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., 1994. **Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11836-11840.
- Lücker, J., Bouwmeester, H.J., Schwab, W., Blaas, J., van der Plas, L.H.W., Verhoeven, H.A., 2001. **Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside.** *The Plant Journal*. 27: 315-324.

Lücker, J., El Tamer, M.K., Schwab W., Verstappen, F.W.A, van der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J., Verhoeven, H.A., 2002. **Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases.** *European Journal of Biochemistry* 269: 3160-3171.

Maeda, T., Takabayashi, J., Yano, S., Takafuji, A., 1999. **Response of the predatory mite, *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae), toward herbivore-induced plant volatiles: variation in response between two local populations.** *Applied Entomology and Zoology* 34:449-454.

Mizell, R.F., Frazier, J.L., Nebeker, T.E., 1984. **Response of the clerid predator *Thanasimus dubius* (F.) to bark beetle pheromones and tree volatiles in a wind tunnel.** *Journal of Chemical Ecology* 10: 177-187.

Price, P.W., Bouton, C.E., Gross, P., McPheron, B.A., Thompson, J.N., Weis, A.E., 1980. **Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 41-65.

Ramachandran, R., Norris, D. M., Phillips, J. K., Phillips, T.W., 1991. **Volatiles mediating plant-herbivore-natural enemy interactions: soyabean looper frass volatiles, 3-octanone and guaicol, as kairomones for parasitoid *Microplitis demolitor*.** *Agricultural Food Chemistry* 39: 2310–2317.

Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbothe, C., 1994. **JIPs and RIPs: The regulation of plant gene-expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens.** *Plant cell* 6: 1197-1209.

Rhoades, D.F., 1985. **Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory.** *American Naturalist* 125: 205-238.

Roda, A.L., Baldwin, T., 2003. **Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work.** *Basic application of Ecology* 4; 15-26.

Ruther, J., 2004. **Male-biased response of garden chafer, *Phyllopertha horticola* L., to leaf alcohol and attraction of both sexes to floral plant volatiles.** *Chemoecology* 14: 187-192.

Shimoda, T., Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Nishioka, T., 2002. **Olfactory responses of two specialist insect predators of spider mites toward plant volatiles from lima bean leaves induced by jasmonic acid and/or methyl salicylate.** *Applied Entomology and Zoology* 37: 535-541.

Shimoda, T., Takabayashi, J., 2001. **Response of *Oligota kashmirica benefica*, a specialist insect predator of spider mites, to volatiles from prey-infested leaves under both laboratory and field conditions.** *Entomology Experimentalis et Applicata* 101: 41-47.

Sigfried, B.D., 1987. **Responses of the pales weevil to natural and synthetic host attractants.** *Journal of Economic Entomology* 62: 383-386.

Takabayashi, J., Dicke, M., 1992. **Response of predatory mites with different rearing histories to volatiles of uninfested plants.** *Entomology Experimentalis et Applicata* 62: 187-193.

Takabayashi, J., Dicke, M., 1996. **Plant-carnivore mutualism through herbivore induced carnivore attractants.** *Trends Plant Science* 1: 109-113.

Takabayashi, J., Dicke, M., Posthumus, A., 1994a. **Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors.** *Journal of Chemical Ecology* 20: 1329-1354.

Takabayashi, J., Dicke, M., Takahashi, S., Posthumus, M.A., Van den Beek, T.A., 1994b. **Leaf age affects composition of herbivore-induced synomones and attraction of predatory mites.** *Journal of Chemical Ecology* 20: 373-386.

Takabayashi, J., Takahashi, S., Dicke, M., Posthumus, M.A., 1995. **Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separate* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants.** *Journal of Chemical Ecology* 21: 273-287.

Thaler, J.S., 2002. **Effect of jasmonite-induced plant responses on natural enemies of herbivores.** *Journal of Animal Ecology* 71: 141-150.

- 
- Traw, M.B., Kim, J., Enright, S., Cipollini, D.F., Bergelson, J., 2003. **Negative cross-talk between salicylate- and jasmonate-mediated pathways in the Wassilewkija ecotype of *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular Ecology* 12:1125-1135.
- Turlings, T.C.J., Bernasconi, M., Bertossa, R., Bigler, F., Caloz, G., Dorn, S., 1998. **The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies.** *Biological Control* 11: 122-129.
- Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Röse, U.S.R., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H., 1995. **How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps.** *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4169-4174.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., Lewis, W.J., 1990. **Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps.** *Science* 250: 1251-1253.
- Steinberg, S., Dicke, M., Vet, L.E.M., 1993. **Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*.** *Journal of Chemical Ecology* 19: 47-60.
- Van den Boom, C. E. M., Van Beek, T.A., Dicke, M., 2002. **Attraction of *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) towards volatiles from various *Tetranychus urticae*-infested plant species.** *Bulletin of Entomological Research* 92: 539-546.
- Van den Boom, C. E. M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., De Groot, A., Dicke, M., 2004. **Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families.** *Journal of Chemical Ecology* 30: 69-89.
- Van Poecke, R.M.P., Dicke M., 2004. **Indirect defense of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant.** *Plant biology* 6: 387-401.

## **Bijlagen**

## Bijlage I: Geurkarakterisering d.m.v. headspace

code	A-pineen	$\beta$ -mycreen	$\beta$ pineen	Lycopen	L-lysine	Ocymeen ( <i>E</i> )
Blanco						
Wild						
LIN-K-4		10.52				11.52
LIN-K-9						11.52
LIN-K-12						11.51
LIN-K-15						
LIN-K-16						11.51
LIN-RJ-6						11.51
LIN-RJ-8						11.52
LIN-RJ-13						11.52
LIN-RJ-23						11.51
LIN-RJ-24		10.52				11.52
Wild						
MYR-K-2	9.53		10.58			
MYR-K-3	9.54					
MYR-K-4	9.53		10.50			
MYR-K-9						
MYR-K-10	9.51					
MYR-K-16	9.53					
MYR-K-21	9.53		10.58			
MYR-RJ-1	9.52		10.58			
MYR-RJ-7	9.53		10.58			
MYR-RJ-12	9.53					
MYR-RJ-13	9.52		10.57			
MYR-RJ-15	9.52		10.58			
MYR-RJ-18	9.53		10.57			
DC-K-1	9.51		10.57		11.31	
DC-K-5	9.52		10.57	10.54		
DC-K-7	9.50					
DC-K-9						
Wild			10.57			
DC-RJ-8	9.51					
DC-RJ-10	9.50		10.56		11.31	
DC-RJ-14	9.50				11.31	
DC-RJ-16	9.51				11.32	

code	D-limoneen	ketone	Ocymeen (Z)	1,4-P-menthadion	Aniline	Linalool	DMNT
Blanco							
Wild							
LIN-K-4			11.81			12.97	13.30
LIN-K-9						12.97	13.32
LIN-K-12			11.80			12.96	13.30
LIN-K-15						12.96	
LIN-K-16						12.96	
LIN-RJ-6			11.80			12.97	13.30
LIN-RJ-8						12.97	13.30
LIN-RJ-13			11.80			12.97	
LIN-RJ-23			11.79			12.95	13.29
LIN-RJ-24			11.80			12.98	
Wild							
MYR-K-2							
MYR-K-3							
MYR-K-4				12.23			
MYR-K-9							
MYR-K-10				12.24			
MYR-K-16				12.22			
MYR-K-21				12.23			
MYR-RJ-1	11.62			12.24			
MYR-RJ-7							
MYR-RJ-12				12.23			
MYR-RJ-13	11.62	11.69		12.23			
MYR-RJ-15	11.62	11.69		12.22			
MYR-RJ-18					12.47		
DC-K-1	11.60			12.23			
DC-K-5				12.23			
DC-K-7				12.21			
DC-K-9							
Wild						12.94	
DC-RJ-8				12.23			
DC-RJ-10				12.23			
DC-RJ-14				12.23			
DC-RJ-16				12.21			

code	A-pyroneen	Allo-ocimeen	Bethamethasone vulerate	Decamethyl 4-terpineol	$\alpha$ -compholenal
Blanco					
Wild					
LIN-K-4		13.62			
LIN-K-9		13.62			
LIN-K-12		13.63			
LIN-K-15					
LIN-K-16		13.62			
LIN-RJ-6		13.62			
LIN-RJ-8		13.61			
LIN-RJ-13		13.61			
LIN-RJ-23		13.61			
LIN-RJ-24					
Wild					
MYR-K-2					
MYR-K-3					
MYR-K-4	13.61			15.02	
MYR-K-9					
MYR-K-10					
MYR-K-16					
MYR-K-21			13.63		13.86
MYR-RJ-1			13.62		13.87
MYR-RJ-7			13.66		
MYR-RJ-12				13.67	
MYR-RJ-13			13.63		
MYR-RJ-15			13.63		13.87
MYR-RJ-18					
DC-K-1			13.62	15.01	13.84
DC-K-5				15.00	
DC-K-7					
DC-K-9					
Wild					
DC-RJ-8				15.00	
DC-RJ-10					
DC-RJ-14					
DC-RJ-16					



code	Myrtenol	Carveol	- $\beta$ pineen	A-terpineol	Berbanol	Benzothiazole	DHS activator
Blanco							
Wild							
LIN-K-4				15.25			
LIN-K-9							
LIN-K-12							
LIN-K-15							
LIN-K-16							
LIN-RJ-6							
LIN-RJ-8							
LIN-RJ-13							
LIN-RJ-23							
LIN-RJ-24							
Wild							
MYR-K-2							
MYR-K-3	15.43						
MYR-K-4	15.44		15.11				
MYR-K-9							
MYR-K-10	15.43						
MYR-K-16			15.10				
MYR-K-21		14.30	15.10		15.80		
MYR-RJ-1			15.10		15.80		
MYR-RJ-7			15.10		15.80		
MYR-RJ-12						16.26	
MYR-RJ-13		14.29	15.10		15.80	16.26	
MYR-RJ-15		14.29	15.10		15.80		
MYR-RJ-18							
DC-K-1		14.29	15.09		15.79		
DC-K-5		14.29	15.09		15.80		
DC-K-7			15.09				16.70
DC-K-9							
Wild							
DC-RJ-8		14.28	15.09		15.80		
DC-RJ-10	15.41		15.08				16.69
DC-RJ-14			15.08		15.77		
DC-RJ-16			15.08				16.69

code	Elixeen	Copaeen	$\beta$ - elemeen	$\alpha$ - gurjuneen	Caryophylleen	$\alpha$ - caryophyleen	Nophthaleen
Blanco							
Wild							
LIN-K-4	18.34						21.39
LIN-K-9						20.79	
LIN-K-12							
LIN-K-15							
LIN-K-16						20.79	
LIN-RJ-6					20.16	20.79	21.38
LIN-RJ-8							
LIN-RJ-13							
LIN-RJ-23							
LIN-RJ-24							
Wild							
MYR-K-2							
MYR-K-3							
MYR-K-4				19.90			21.37
MYR-K-9				19.90			
MYR-K-10							
MYR-K-16							
MYR-K-21							
MYR-RJ-1							
MYR-RJ-7							
MYR-RJ-12				19.88	20.16		
MYR-RJ-13							
MYR-RJ-15							
MYR-RJ-18							
DC-K-1							
DC-K-5		18.52		19.89			
DC-K-7				19.90			
DC-K-9							
Wild			19.33		20.13	20.13	
DC-RJ-8							
DC-RJ-10							
DC-RJ-14		18.50					
DC-RJ-16							

<b>code</b>	<b><math>\alpha</math>-farnase</b>	<b>Nerolidol</b>	<b>Syvaleen</b>	<b>Azuleen</b>	<b>Heptadecane</b>
Blanco					
Wild					
LIN-K-4		22.05			
LIN-K-9		22.04			
LIN-K-12		22.04			
LIN-K-15		22.05			
LIN-K-16	22.04				
LIN-RJ-6		22.04			
LIN-RJ-8		22.03	22.23		
LIN-RJ-13					
LIN-RJ-23		22.03	22.23		
LIN-RJ-24		22.03			
Wild					
MYR-K-2					
MYR-K-3					
MYR-K-4				23.47	
MYR-K-9					
MYR-K-10					
MYR-K-16					
MYR-K-21					23.99
MYR-RJ-1					
MYR-RJ-7					
MYR-RJ-12					
MYR-RJ-13					
MYR-RJ-15					
MYR-RJ-18					
DC-K-1					
DC-K-5					
DC-K-7					
DC-K-9					
Wild					
DC-RJ-8					
DC-RJ-10					
DC-RJ-14					
DC-RJ-16					

**Bijlage II: Endogene geurkarakterisering**

9-5-2004

Plant: aardappel

Leeftijd: "4-weken" (2 weken in vitro, 2 weken in kas)

		Retentietijd/ geurcomponent					
		6.17	8.78	10.27	10.36	13.00	13.00
	gewicht (g)	$\alpha$ -pineen	Linalool	Myrtenol	Decanal	$\alpha$ - Guaine	$\beta$ - Elemeen
Blanco							
DC-K-1	0.03	10000					70000
DC-K-5	0.03	100					30000
DC-K-7	0.07						300000
DC-K-9	0.04						80000
Wild	0.04						
DC-RJ-8	0.03						
DC-RJ-10	0.03				15000		
DC-RJ-14	0.06						
DC-RJ-16	0.06				15000		90000
MYR-K-2	0.06						
MYR-K-3	0.05				20000		20000
MYR-K-4	0.03						
MYR-K-9	0.05						
MYR-K-10	0.08			11500			
MYR-K-16	0.03					20000	
MYR-K-21	0.04						
MYR-RJ-1	0.04				40000		
MYR-RJ-7	0.04						
MYR-RJ-12	0.03						
MYR-RJ-13	0.05						
MYR-RJ-15	0.04						
MYR-RJ-18	0.05						
LIN-RJ-6	0.03		3000		24000		
LIN-RJ-8	0.04		120000				
LIN-RJ-13	0.03		32000				
LIN-RJ-23	0.03		42000				
LIN-RJ-24	0.05		69000		22000		
Wild	0.08						
LIN-K-12	0.07		39000		20000		
LIN-K-4	0.04		40000				
LIN-K-9	0.07						
LIN-K-15	0.06		75000		20000		
LIN-K-16	0.04						

	Retentietijd/ geurcomponenten					
	13.46	13.73	13.55	13.93	14.23	14.23
	<b>Caryophylleen</b>	<b><math>\beta</math>- Farnaseen</b>	<b><math>\alpha</math>- farneseen</b>	<b>Humuleen</b>	<b><math>\alpha</math>- bergamoteen</b>	<b>Germacreen D</b>
Blanco						
DC-K-1		300000	20000	16000		160000
DC-K-5		200000		100000		90000
DC-K-7		1000000	200000	400000		1000000
DC-K-9		300000	40000	140000		220000
Wild						
DC-RJ-8						
DC-RJ-10	120000	18000		18000		
DC-RJ-14						
DC-RJ-16						
MYR-K-2						
MYR-K-3		85000		30000		60000
MYR-K-4						
MYR-K-9						
MYR-K-10						
MYR-K-16		12000	60000	30000		
MYR-K-21						
MYR-RJ-1	650000			100000		200000
MYR-RJ-7						
MYR-RJ-12						
MYR-RJ-13						
MYR-RJ-15						
MYR-RJ-18						
LIN-RJ-6	40000					10000
LIN-RJ-8	120000	10000				50000
LIN-RJ-13	32000					
LIN-RJ-23	400000					
LIN-RJ-24	56000				24000	24000
Wild	450000	150000				
LIN-K-12	110000					125000
LIN-K-4	14000					
LIN-K-9						
LIN-K-15						
LIN-K-16		125000		40000		90000

	Retentietijd/ geurcomponenten					
	14.32	14.39	14.61	14.61	14.98	14.98
	$\alpha$ -zingibereen	Epizonareen	$\bar{i}$ -muuroleen	$\bar{i}$ -cadineen	Cadineen	$\alpha$ -muuroleen
Blanco						
DC-K-1		160000	20000			
DC-K-5		100000	90000			
DC-K-7		300000	500000			
DC-K-9		120000	140000			
Wild						
DC-RJ-8						
DC-RJ-10						15000
DC-RJ-14						
DC-RJ-16		150000	220000		100000	
MYR-K-2						
MYR-K-3		20000	40000			
MYR-K-4						
MYR-K-9						
MYR-K-10						
MYR-K-16			38000	38000	20000	
MYR-K-21						
MYR-RJ-1				150000		
MYR-RJ-7						
MYR-RJ-12						
MYR-RJ-13						
MYR-RJ-15						
MYR-RJ-18						
LIN-RJ-6				10000		
LIN-RJ-8				35000		
LIN-RJ-13				10000		
LIN-RJ-23						
LIN-RJ-24						
Wild	50000			100000	50000	
LIN-K-12				70000	30000	
LIN-K-4						
LIN-K-9						
LIN-K-15						
LIN-K-16				50000		

	Retentietijd/ geurcomponenten				
	15.11	15.11	15.79	15.79	18.95
	<b>Geranyl isobutyrate</b>	<b>Nerolidol</b>	<b>Globulol</b>	<b>Ledol</b>	<b>Farnesol</b>
Blanco					
DC-K-1				25000	
DC-K-5					
DC-K-7		100000		200000	
DC-K-9					
Wild					
DC-RJ-8					
DC-RJ-10					
DC-RJ-14					
DC-RJ-16				40000	
MYR-K-2					
MYR-K-3					40000
MYR-K-4					
MYR-K-9					
MYR-K-10					
MYR-K-16				13000	
MYR-K-21					
MYR-RJ-1				40000	
MYR-RJ-7					
MYR-RJ-12					
MYR-RJ-13					
MYR-RJ-15					
MYR-RJ-18					
LIN-RJ-6					
LIN-RJ-8					
LIN-RJ-13					
LIN-RJ-23				32000	
LIN-RJ-24	24000				
Wild				29000	
LIN-K-12		20000	35000		20000
LIN-K-4		20000			16000
LIN-K-9					
LIN-K-15		29000			
LIN-K-16				18000	20000