

An array of responses to insect feeding in Brassica

Colette Broekgaarden

Op 21 oktober 2008 promoveerde Colette Broekgaarden aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'An array of responses to insect feeding in Brassica'. Promotor was Prof. Dr. M. Dicke van de leerstoelgroep Entomologie. Co-promotor was Dr. B. Vosman, verbonden aan Plant Research International (WUR). Het onderzoek werd voornamelijk uitgevoerd bij Plant Research International en gefinancierd door het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV).

Inleiding

In hun natuurlijke omgeving worden planten continu belaagd door allerlei planteneterende insecten. Om te kunnen overleven hebben ze verschillende strategieën ontwikkeld om deze aanval te verhinderen of de gevolgen te verminderen. Deze verdedigingsmechanismen worden directe of indirecte verdediging genoemd en kunnen altijd aanwezig zijn of geactiveerd worden in de aanwezigheid van planteneterende insecten. Directe verdediging beïnvloedt de groei en ontwikkeling van de insecten in de vorm van bijvoorbeeld morfologische barrières (zoals bladharen of een waslaag) of de productie van stoffen die voor het insect schadelijk zijn. Indirecte verdediging bevordert de aantrekking van natuurlijke vijanden van de insecten door bijvoorbeeld het produceren van lokstoffen. Het transcriptieprofiel van een plant, d.w.z. de groep genen die wordt afgelezen en overgeschreven naar RNA, bepaalt welke verdedigingsmechanismen worden gebruikt tegen de aanvallende planteneterende insecten. 'Microarrays' worden veel gebruikt om transcriptieprofielen of reacties van planten te onderzoeken. Een microarray is een glasplaatje met daarop een grote hoeveelheid 'spots' met in elke spot een DNA-fragment van een ander gen. Met microarrays is het mogelijk om de transcriptieprofielen van twee verschillende behandelingen of rassen te vergelijken. Materiaal van monster A wordt gelabeld met fluorescerend groen terwijl materiaal van monster B wordt gelabeld met fluorescerend rood. Beide monsters worden vervolgens samen

op de microarray gegoten zodat het aanwezige RNA in de monsters kan binden aan de passende genen op de microarray. Wanneer de microarray onder de fluorescentiemicroscoop bekeken wordt, zijn er drie mogelijkheden: een spot is groen (het gen is alleen actief in monster A), rood (het gen is alleen actief in monster B), of geel (het gen is actief in beide monsters). Het principe van de microarray-technologie is schematisch weergegeven in figuur 1.

In de Kruisbloemigenfamilie (Brassicaceae) zijn de meeste microarray-studies uitgevoerd met de modelplant *Arabidopsis thaliana* (zandraket). Hierbij is voornamelijk gekeken naar de transcriptiereactie van deze plant op insectenvraat. In zijn natuurlijke omgeving komt de zandraket echter niet of nauwelijks in aanraking met planteneterende insecten waardoor deze plant minder geschikt is om de effecten van transcriptiereacties op insectenontwikkeling te onderzoeken. Andere kruisbloemigen, zoals witte kool (*Brassica oleracea* var. *capitata*), zijn meer geschikt voor dit doel. Het totale DNA van witte kool en zandraket komt voor 85% overeen, waardoor het mogelijk is om genetische technieken van de modelplant te gebruiken voor het bestuderen van de verdedigingsmechanismen in *Brassica*-soorten. In dit onderzoek werden daarom microarrays gebruikt die alle genen van de zandraket vertegenwoordigen om transcriptiereacties van *Brassica*-soorten op insectenvraat te bestuderen.

Verschiedende verdedigingsstrategieën van planten hebben een verschillend effect op de groei en ontwikkeling van planteneters. Variatie in verdediging tussen planten van dezelfde soort, ook wel intraspecifieke variatie genoemd, speelt daarom een belangrijke rol in plant-insectinteracties en kan worden gebruikt voor het identificeren van verdedigingsmechanismen. Deze variatie kan ook het voorkomen van insecten beïnvloeden op planten die groeien onder natuurlijke omstandigheden. Verschillen in transcriptieprofielen of reacties zijn vaak verantwoordelijk voor intraspecifieke variatie in groei en ontwikkeling van insecten. Er zijn maar weinig onderzoeken

PROMOTIES

die resultaten van insectengroei en -ontwikkeling koppelen aan microarray-analyses. Nog minder is bekend over intraspecifieke variatie in transcriptieprofielen van planten onder veldomstandigheden waarin ze worden blootgesteld aan allerlei belagers en ook aan andere vormen van stress.

Dit onderzoek maakte deel uit van een onderzoeksprogramma dat probeerde intraspecifieke variatie in plantenverdediging te koppelen aan biodiversiteit van plantenetende insecten en hun natuurlijke vijanden. Transcriptie-analyses van planten werden gecombineerd met groei, ontwikkeling en vóórkomen van insecten om genen te identificeren die belangrijk zijn in de verdediging tegen insecten in gecultiveerde en wilde *Brassica*-soorten, zowel in de kas als in het veld.

Intraspecifieke variatie tussen witte koolrassen in reactie op insectenvraat

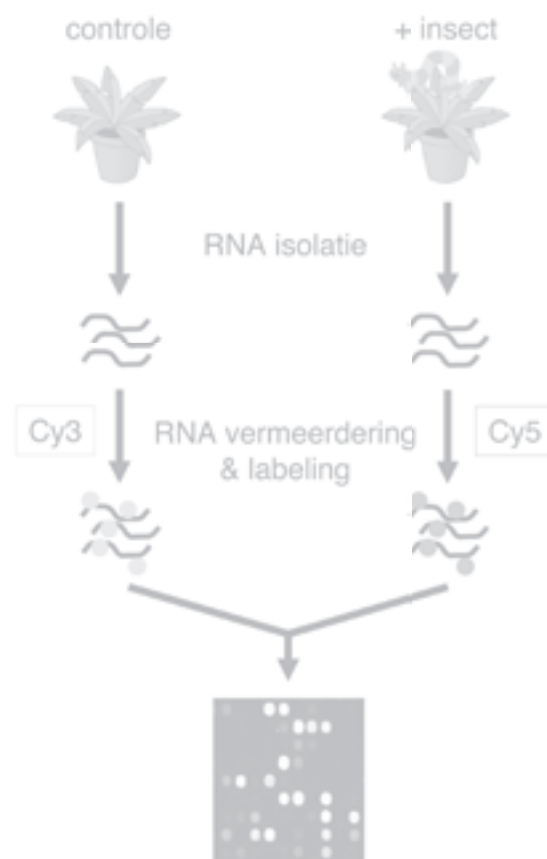
Rupsen van het kleine koolwitje (*Pieris rapae*) eten van bladeren waarbij ze enorme schade aanrichten aan de plant. De melige koolluis (*Brevicoryne brassicae*) zuigt sap uit het vaatweefsel van de plant wat leidt tot het krullen of verbleken van de bladeren. Beide insecten eten van witte kool en vormen een ernstig probleem tijdens de teelt ervan. Om meer te weten te komen over de interactie tussen witte koolrassen en deze insecten is gekeken naar groei en ontwikkeling van de insecten en naar de transcriptiereacties van de plant.

De resultaten laten zien dat rupsen langzamer groeiden en zich sneller ontwikkelden tot een pop op het ras 'Rivera' dan op het ras 'Christmas Drumhead'. 'Rivera' is dus beter bestand tegen rupsenvraat dan 'Christmas Drumhead'. Verschillen in groei en ontwikkeling van de melige koolluis op vier witte koolrassen is ook aangetoond. Bladluizen die uitgezet waren ontwikkelden een kleinere populatie op de rassen 'Rivera' en 'Lennox' dan op de rassen 'Christmas Drumhead' en 'Badger Shipper'. Voor beide insecten laten dezelfde rassen dus de sterkste relatieve verdediging zien.

Om te onderzoeken waardoor de gevonden verschillen in insectengroei en -ontwikkeling kunnen worden verklaard, is gekeken naar de transcriptiereacties van de rassen 'Rivera' en 'Christmas Drumhead'. Met behulp van microarrays werden controleplanten vergeleken met planten die waren aangevallen door insecten om te zien welke genen werden geactiveerd door de aanwezigheid van de insecten. De transcriptie-

reacties van de rassen na rupsenvraat verschilde in timing, en er werden ook verschillende genen aangeschakeld. Jasmonzuur is een belangrijk plantenhormoon dat betrokken is bij de activering van verdedigingsmechanismen tegen planteneters. Na het aanbrengen van een oplossing met jasmonzuur op de bladeren verschilden de transcriptiereacties van de rassen niet in timing. De transcriptiereactie na deze behandeling was vergelijkbaar met die na rupsenvraat. De meerderheid van de door rupsen aangeschakelde genen in de twee witte koolrassen werden ook aangeschakeld door jasmonzuur. Wanneer de rassen werden aangevallen door melige koolluis, werden er minder genen geactiveerd in de rassen ('Rivera' en 'Christmas Drumhead') dan na rupsenvraat.

De transcriptiereacties op een aanval door rupsen of bladluizen waren zeer specifiek per ras en een aantal genen die iets te maken zouden kunnen hebben met plantenverdediging was alleen of sterker aangeschakeld in 'Rivera'. De eiwitten die ontstaan na het activeren van deze genen kunnen verantwoordelijk zijn voor de gevonden



Figuur 1. Schematische weergave van de microarray-technologie.



Figuur 2. Schade door rupsen (links) en luizen (rechts) op kool.

verschillen in groei en ontwikkeling van de insecten. Door een van deze genen uit te schakelen in een plant is het mogelijk om de functie van dit gen te onderzoeken. Helaas is het nog niet mogelijk om dit te doen in *Brassica*-planten. Om toch een idee te krijgen over de functie van bepaalde genen zijn knock-out mutanten, planten waarin één bepaald gen is uitgeschakeld, van de zandraket gebruikt. Onderzoek naar de groei en ontwikkeling van de insecten op deze knock-out planten liet zien dat een 'trypsine- en protease-inhibitor'-gen een negatief effect had op zowel rupsen als bladluizen.

De resultaten van de interactie tussen witte koolrassen en rupsen van het kleine koolwitje of melige koolluizen laten duidelijk zien dat er intraspecifieke variatie is voor insectengroei en transcriptiereacties van planten. Een aantal genen die alleen aangeschakeld werden in 'Rivera' kan de basis zijn voor directe verdedigingsmechanismen tegen deze plantenetende insecten.

Interspecifieke variatie tussen witte koolcultivars en wilde zwarte mosterd in reactie op plantenetende insecten

Het bestuderen van interspecifieke variatie, d.w.z. verschillen tussen planten van verschil-

lende soorten, kan meer inzicht geven in de verdedigingsmechanismen van planten in reactie op de aanwezigheid van insecten. Dit is mogelijk door de reacties van wilde planten en rassen te vergelijken. Daarom is ook gekeken naar de groei van rupsen van het kleine koolwitje en melige koolluizen op wilde zwarte mosterdplanten (*Brassica nigra*) en naar de transcriptiereactie van deze plant op een aanval door deze insecten. De resultaten werden vervolgens vergeleken met de resultaten verkregen van de witte koolrassen. De transcriptiereacties van zwarte mosterd waren, net als bij de witte kool rassen, afhankelijk van het aanwezige insect.

De transcriptiereacties suggereren dat bepaalde verdedigingsmechanismen die geactiveerd worden in zwarte mosterd niet actief zijn in witte koolrassen en andersom. Dit wil zeggen dat beide *Brassica*-soorten waarschijnlijk verschillende verdedigingsstrategieën gebruiken om een aanval van rupsen van het kleine koolwitje te overleven. Het lagere aantal rupsen dat werd gevonden op zwarte mosterdplanten in het veld en de betere groei van rupsen op de wilde *Brassica* dan op de *Brassica*-rassen draagt bij aan deze suggestie. Zwarte mosterd beïnvloedt waarschijnlijk de aantrekking van vlinders omdat een gen betrokken bij dit proces alleen actief was in deze plant. Een aantal genen die betrokken zijn

bij directe verdediging was juist alleen geactiveerd in de witte koolrassen 'Rivera' en 'Christmas Drumhead'.

De groei en ontwikkeling van de melige koolluis op zwarte mosterd is ook onderzocht en liet zien dat er, na een bepaalde tijd, meer luizen aanwezig waren op zwarte mosterd dan op de witte koolrassen. Microarray-experimenten lieten zien dat zwarte mosterd een lager aantal, en ook andere genen activeert in reactie op een aanval door luis dan de witte koolrassen. Het verschil in bladluiscroei en -ontwikkeling tussen zwarte mosterd en de witte koolrassen zou veroorzaakt kunnen worden doordat een aantal verdedigingsgenen niet in zwarte mosterd wordt geactiveerd en wel in witte kool.

Intraspecifieke variatie tussen witte koolrassen in het veld

Populaties van insecten op planten in het veld worden beïnvloed door intraspecifieke plantenvariatie. Alle bovengenoemde experimenten zijn uitgevoerd onder zorgvuldig gecontroleerde omstandigheden in een kas waarbij planten werden aangevallen door één enkele insectensoort. In het veld hebben planten echter te maken met een heel scala aan stressfactoren, zoals wind, regen, ziektes of allerlei insecten. Resultaten verkregen uit kasexperimenten zijn niet noodzakelijkerwijs een afspiegeling van de veldsituatie. Veldexperimenten zijn daarom nodig om te bepalen of de resultaten uit kasexperimenten kunnen worden gebruikt in het veld. Het tellen van melige koolluis op vier witte koolrassen in het veld liet zien dat de groei en ontwikkeling van dit insect relatief ongeveer gelijk was in kas en veld. De verdediging van de rassen

is daarom waarschijnlijk onafhankelijk van de omgevingsfactoren. Vroeg in het seizoen was het aantal natuurlijk voorkomende planteneterende insecten in het veld gelijk op 'Rivera' en 'Christmas Drumhead'. Op dit tijdstip waren de transcriptie-profielen van de beide rassen nagenoeg gelijk. Later in het seizoen waren er duidelijke verschillen te zien in de verdeling, het voorkomen en de biodiversiteit van planteneterende insecten op beide rassen. De rassen ontwikkelen zich waarschijnlijk verschillend tijdens het groeiseizoen. Microarray-experimenten lieten zien dat de transcriptieprofielen van de rassen later in het seizoen verschilden in 51 genen. Een aantal verdedigingsgenen was sterker geactiveerd in het ras met de kleinste aantallen insecten. Deze resultaten laten zien dat intraspecifieke plantenvariatie tussen witte koolrassen zich ontwikkelt door het seizoen heen, wat verschillen in insectenpopulaties veroorzaakt. Deze verschillen in insectenpopulaties kunnen, in ieder geval gedeeltelijk, worden gekoppeld aan de verschillen in activering van bepaalde verdedigingsgenen.

Conclusies

De resultaten in dit proefschrift laten zien dat intra- en interspecifieke variatie tussen *Brassica*-planten een sterk effect hebben op de groei van planteneterende insecten en op de transcriptie-reacties van de plant na aanval door insecten, zowel in de kas als in het veld. Het combineren van onderzoek naar transcriptieprofielen van de plant en de groei van insecten, draagt bij aan het beter begrijpen van de interactie tussen *Brassica*-planten en planteneterende insecten. Dit proefschrift vormt de basis voor het verder onderzoeken van directe verdedigingsmechanismen van witte kool.

Nieuw e-mailadres?

Geef het door voordat het oude verloopt

Bent u verhuisd of hebt u een nieuw e-mailadres? U kunt uw nieuwe adresgegevens zelf aanpassen op de website www.knpv.org. Wanneer u uw inloggegevens kwijt bent klikt u op 'wachtwoord vergeten'. Uw gegevens worden dan naar uw – bij ons bekende – e-mailadres gestuurd. Dit duurt ongeveer een kwartier. Werkt uw oude adres niet meer, volg dan de aanwijzingen op de website. Wanneer de KNPV niet over een werkend e-mailadres beschikt ontvangt u ook geen automatische bevestiging van bijvoorbeeld uw opgave voor de najaarsvergadering.