

Stiletpenetratie door bladluizen

elektropenetratie-gramsignalen uit groene diepten

De penetratie van planten door bladluisstiletten laat zich goed onderzoeken met het elektrope-
netratiegram (EPG), een registratiesysteem waar-
bij plant en insect deel uitmaken van een elek-
trisch circuit. Het blijkt dat juist de activiteiten
die kenmerkend zijn voor het penetratiegedrag
van het insect en de posities van de stiletpunt
in het plantenweefsel het EPG-systeem elek-
trisch beïnvloeden. Alleen de beperking in loco-
motie door bevestiging aan de zeer dunne flexi-
bele elektrodedraad beïnvloedt het gedrag van
de bladluis enigszins. Een groot aantal details
van de plant-bladluisinteracties tijdens stiletpe-
netratie is door EPG-studies opgehelderd, maar
dit heeft mogelijk een nog groter aantal vragen
opgeroepen over wat er zich afspeelt in de diep-
ten van de plantenweefsels.

Entomologische Berichten 63(5): 110-116

Trefwoorden: voedselopname, voedselplant, floëmsap

Inleiding

Bladluizen voeden zich met floëmsap, net als veel andere Homoptera. In tegenstelling tot de meeste herbivore insecten kunnen bladluizen niet direct met hun maaltijd beginnen na aankomst op de plant omdat de monddelen, de stiletten, eerst tot in het floëem van de plant moeten penetreren. Gedurende deze penetratie wordt ook de waardplant geselecteerd (Pollard 1973). Alhoewel bij sommige soorten enige voorselectie kan plaatsvinden op basis van plantengeuren (Picket *et al.* 1992) wordt de uiteindelijke acceptatie of verwerping van de voedselplant pas na stiletpenetratie gemaakt. Deze testpenetraties zijn van groot land- en tuinbouwkundig belang omdat veel plantenvirussen dan al verspreid worden (Prado & Tjallingii 1994; Martin *et al.* 1997).

Om de stiletpenetratie-activiteiten door bladluizen te onderzoeken introduceerden de Californische onderzoekers McLean & Kinsey (1964) een elektrisch registratiesysteem. Dit systeem is door ons later verbeterd en staat nu bekend als de elektrope-
netratiegram- (EPG) techniek (Tjallingii 1985, 1988, 1990, 2000, Tjallingii & Hogen Esch 1993, Prado & Tjallingii 1994, 1997). Dit stuk geeft het huidige inzicht weer in de penetratie-activiteiten van bladluizen en de belangrijke bijdrage daaraan door het EPG-onderzoek. Hier zal het alleen over bladluis-EPG's gaan, die tussen soorten een grote consistentie vertonen. EPG's van andere herbivore insecten met stekende monddelen, die momenteel in toenemende

Freddy Tjallingii

Wageningen Universiteit
Laboratorium voor Entomologie
Binnenhaven 7
6709 PD Wageningen
freddy.tjallingii@wur.nl



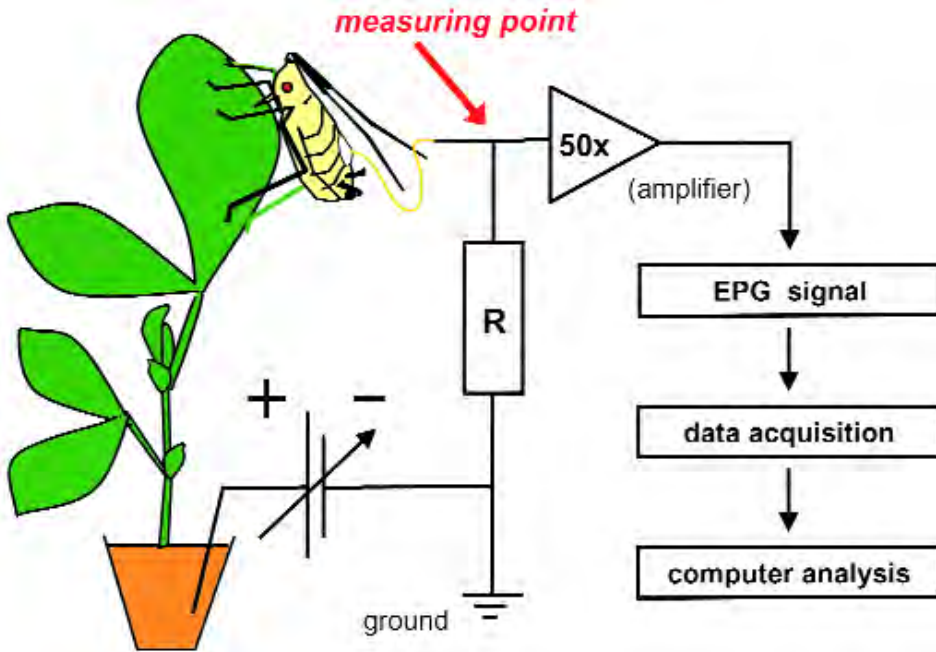
mate onderzocht worden (Homoptera als Cicadellidae, Aleurodidae, Pseudococcidae en Psyllidae, maar ook Heteroptera en Thysanoptera), zijn verschillend van bladluis-EPG's en komen hier niet of slechts incidenteel aan de orde.

Het EPG-systeem

In principe meet het EPG-systeem wisselende voltages in een elektrisch circuit waarin de bladluis (of een ander stekend insect) en de plant zijn opgenomen (figuur 1). De bladluis is bevestigd aan een zeer dunne (10 of 20 μm) gouddraadelektrode, terwijl een stevige koperelektrode in de aarde van een (opgepotte) plant is gestoken. (Planten in het veld vereisen een speciaal aangepaste systeem.) Zodra de bladluis zijn stiletten in de plant steekt wordt het circuit gesloten en ontstaan de spanningsfluctuaties (Volt) bij het meetpunt. Na versterking (standaard 50-100 keer) kunnen de signalen zichtbaar gemaakt worden met elk daarvoor geschikt apparaat - vroeger een oscilloscoop of papierrecorder, tegenwoordig meestal een computermonitor - en worden vastgelegd (nu volledig digitaal). Een overzicht van een EPG

Tabel 1. Golfvormcorrelaties met bladluisactiviteit en stiletpuntposities in het plantenweefsel. pd = potential drop
Wave forms correlations with aphid activities and stylet tip positions in plant tissue. pd = potential drop

golfvorm <i>wave form</i>	fase <i>phase</i>	positie <i>position</i>	activiteit <i>activity</i>
A, B, C, (F)	path	any tissue	intercellular penetration
pd	path	any tissue	intracellular puncture
G	xylem	xylem	active sap ingestion
E1	phloem	phloem	saliva excretion
E2	phloem	phloem	passive sap ingestion and salivation



Figuur 1. Het EPG-systeem. Zodra de bladluistilletten de plant penetreren wordt het circuit gesloten en kan de fluctuerende spanning bij het meetpunt (measuring point) versterkt en geregistreerd worden door een computer. Deze signalen worden later geanalyseerd. *The EPG-system. As soon as the aphid penetrates the plant, the circuit is closed and the fluctuating voltage at the measuring point is amplified and recorded in a computer. Signals are analysed later.*

met details van enkele van de belangrijkste golfvormen is te zien in figuur 2, terwijl in tabel 1 de bijbehorende weefsellocaties van de stiletpunt en stiletpenetratie-activiteiten zijn weergegeven. De belangrijkste golfvormcorrelaties zijn nu weliswaar experimenteel opgehelderd, maar verder onderzoek hiernaar wordt momenteel nog voortgezet. De spanningsfluctuaties in het EPG worden veroorzaakt door de fluctuerende elektrische weerstand van de bladluis, met name door het openen en sluiten van een klep in respectievelijk het voedsel- en speekselkanaal. Zulke fluctuaties worden aangeduid als de weerstandcomponent (R-component) in het EPG. Anderzijds worden er ook fluctuerende voltages gegenereerd in het systeem, bijvoorbeeld door de membraanpotentialen van plantencellen die deel uitmaken van het circuit zodra de stiletpunt het plasmalemma van een cel penetreert. Dit soort fluctuaties worden aangeduid als de elektromotorische krachtcomponent (emk-component) in het EPG. Het originele systeem dat McLean & Kinsey (1964) introduceerden meet uitsluitend de R-component van het EPG, terwijl in het huidige EPG-systeem beide componenten gemeten worden (Tjallingii 2000).

De EPG-golfvormen zijn gekarakteriseerd in termen van amplitude (Volt), frequentie (Hertz), voltageniveau (Volt) en belangrijkste elektrische origine (R of emk). Ze worden aangeduid met een letter, alfabetisch, en min of meer naar volgorde van voorkomen in de tijd. Voor het gemak zijn deze golfvormen gegroepeerd in drie 'fasen', overeenkomend met een activiteit of weefsel: (stilet)pad-, xyleem- en floëmfase (figuren 2 en 3). De padfase reflecteert mechanische penetratie van de stilleten door het weefsel, van epidermis tot xyleem en floëem.

Stiletpad-activiteiten

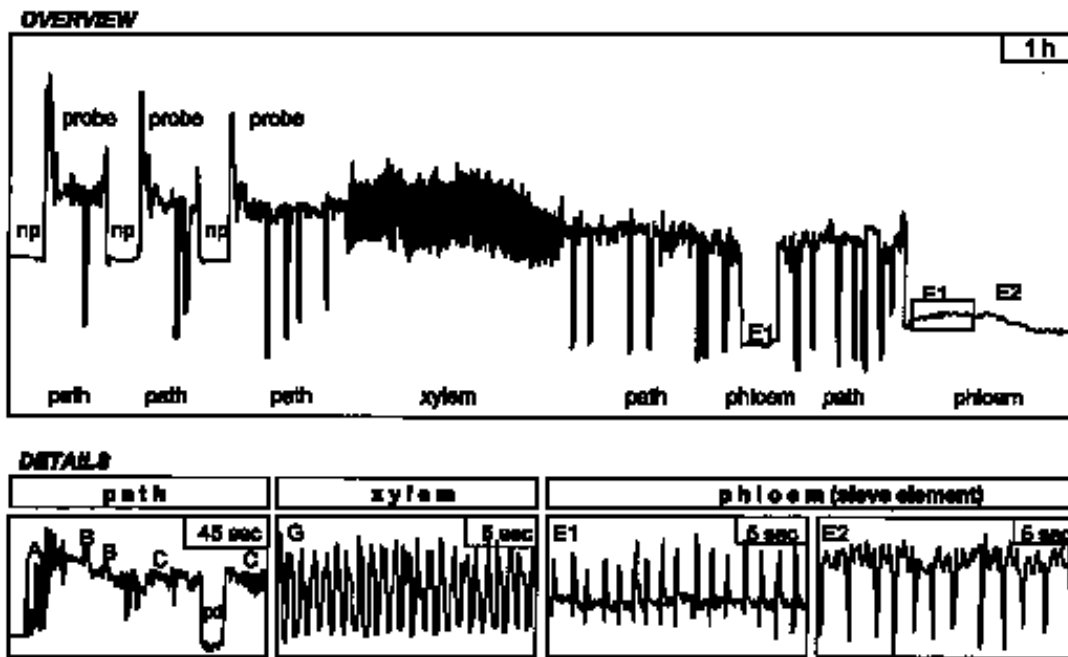
Het EPG van het stiletpad in planten werd onderzocht in combinatie met transmissie-elektronenmicroscopie (TEM), hetgeen een veel betere beeldresolutie geeft dan lichtmicro-

scopie. Figuur 3 laat een TEM-reconstructie zien van een bladdoorsnede met het complete stiletpad, van epidermis door het mesofyl tot in een vaatbundel (Tjallingii & Hogen Esch 1993). Stylectomie (snelle stiletamputatie) vond plaats tijdens de eerste floëmfase (E1/E2-golfvorm) die deze bladluis vertoonde. De stiletweg bleek veel zijtakken te hebben waaruit de stilleten zich teruggetrokken hadden omdat het geschikte doel blijkbaar niet bereikt was. De stilleten waren daarbij ook door het vaatbundelweefsel gegaan en hadden het xyleem twee keer aangeprikt (golfvorm G), maar de eerste floëmfase heeft uiteindelijk pas plaatsgevonden nadat de stilleten zich geheel uit de vaatbundel hadden teruggetrokken en daarin opnieuw gepenetreerd waren tot in het zeevat waarin de stiletpunt te zien is (figuur 3).

Voorafgaand aan de stiletpenetratie wordt enig gelerend (geleivormend) speeksel afgescheiden op de epidermis van het blad, de zogenaamde 'salivary flange' (nauwelijks zichtbaar in figuur 3). In het EPG wordt het eerste signaal echter

Kader 1. Correlatie van de pd-golfvorm in het EPG met een intracellulaire stilet punctie

Het bladluis-EPG van plantpenetraties vertoont veelvuldig de 'potential drop' (pd-golfvorm) terwijl die in diëtpenetraties ('kunstfloëmsap') geheel ontbreekt. Na toevoeging aan het diët van geïsoleerde plantenprotoplasten (losse mesofylcellen uit weefsel waarvan het celwandmateriaal enzymatisch is verwijderd) werden de pd's echter ook in diëtpenetraties zichtbaar. Bovendien kwam het pd-voltage (Y-as in figuur 2 [kader linksonder] en in figuur 5 [EPG]) van protoplasten en van de complete plant overeen met literatuurwaarden van het membraanpotentiaal van plantencellen (-100 tot -200 mV). De bladluistilletten zijn in de EPG-opzet dus een soort zelf-penetrerende elektroden waarmee de extra- en intracellulaire potentiaal in de plant gemeten kan worden (met inachtneming van enkele correcties).



Figuur 2. Het EPG. Boven: 1-uursoverzicht met belangrijkste golfvormen. Onder: golfvormen gegroepeerd in de belangrijkste gedragsfasen. Golfvormen A, B, C en pd vormen samen de stiletpadfase (path). De xyleemfase (xylem) heeft alleen golfvorm G, de floëemfase (phloem) heeft golfvormen E1 en E2 (eerste floëemfase alleen E1). Probe = periode van stiletpenetratie, np = non-penetratie.

The EPG. Top: a 1-hour overview with the major waveforms. Bottom: details of the three main phases (path, xylem, and phloem phase) grouped into the most important wave forms. Waveforms A, B, C and pd together form the stylet path phase. The xylem phase has only waveform G, the phloem phase has waveforms E1 and E2 (first phloem phase has only E1). Probe = period of stylet penetration, np = non-penetration.

pas zichtbaar als er elektrisch contact is tussen de vloeistof in de stiletkanalen (figuur 4) en de intercellulaire vloeistof in de plant. Deze beide vloeistoffen bevatten geïoniseerde zouten die geleidend zijn. Op het moment dat de stiletten door de niet-geleidende was op de cuticula van de plant breken wordt het circuit gesloten en wordt de eerste golfvorm A zichtbaar (tabel 1); dit is pas na afscheiding van de 'salivary

flange'. Spoedig volgt dan golfvorm B, een langzame golf met hoge amplitude (figuur 2, path, vakje 1 linksonder). Elke B-golf reflecteert de excretie van een 'portie' gelerend scheidingsmechanisme in de ruimte die de stiletpunt mechanisch gemaakt heeft door de (secundaire) celwandvezels uit elkaar te duwen. Het speeksel is vloeibaar als het de stiletpunt verlaat, maar blijkt in minder dan een seconde te geleren onder

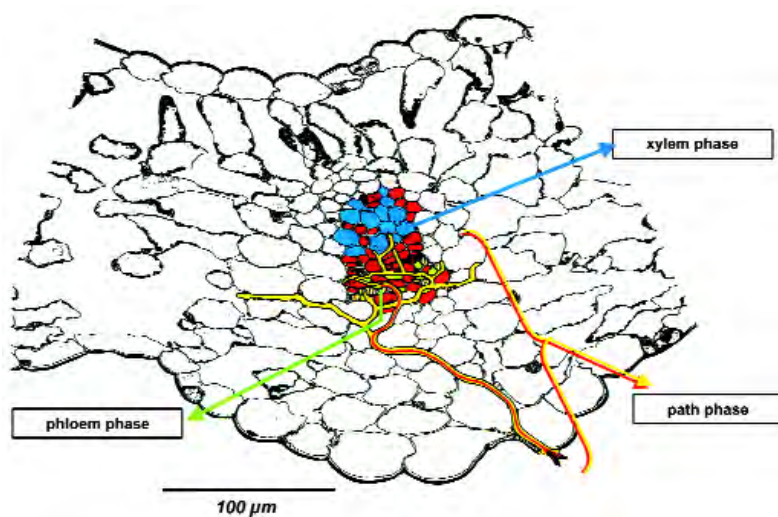
Kader 2. Virustransmissie door bladluizen

De ernstigste economische schade door bladluizen wordt veroorzaakt door de overdracht van plantenvirussen. De belangrijkste door bladluizen overgebrachte virussen zijn in twee groepen te onderscheiden: die met een persistente en die met een niet-persistente overdracht (ook is er nog een groep met een 'semi-persistente' overdracht, die van minder belang is).

De persistente virussen zijn 'circulatief': de virusdeeltjes worden via de darm naar de hemolymfe (het 'bloed') vervoerd en dan naar de speekselklier. Via het speeksel worden dan nieuwe planten geïnfecteerd. Door 'opslag' in de hemolymfe (soms met, soms zonder vermeerdering aldaar: 'propagatief' respectievelijk 'non-propagatief') kan een bladluis lang infectieus blijven en heeft de vervelling bij een juveniel individu geen verlies van besmettelijkheid tot gevolg (vandaar: persistent). De overdracht van persistente virussen vindt tijdens floëempenetraties plaats want (toevallig?) zijn de persistente virussen floëemgebonden. Ze verspreiden zich systemisch, maar niet of nauwelijks buiten het floëem, de zeefvaten en begeleidende cellen. Waarschijnlijk speelt hun relatieve plasmadesmata-

tale isolatie van het overige weefsel daarbij een belangrijke rol.

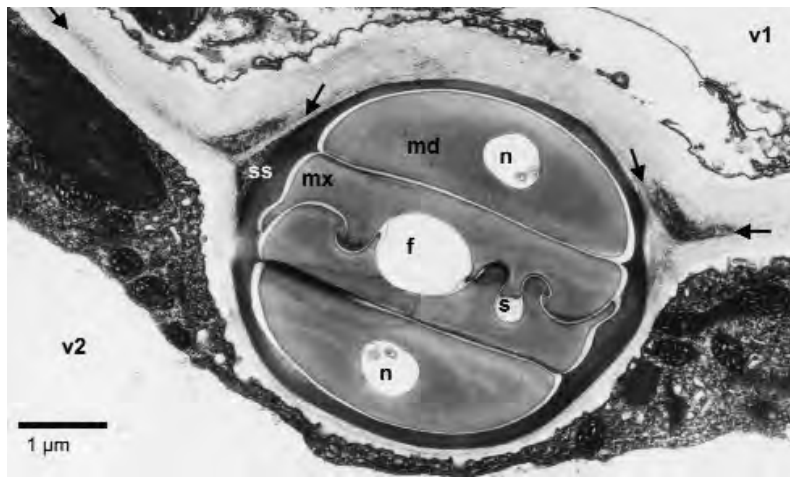
De non-persistente virussen zijn 'non-circulatief': de virusdeeltjes worden niet door de darmwand getransporteerd. De binding ('opslag') vindt plaats aan de binnenwand van het stiletkanaal. Met name het gefuseerde deel van de beide stiletkanalen aan de punt van de maxillaire stiletten lijkt hierbij van bijzonder belang (figuur 5). Dit is maar een klein oppervlak en als een bladluis een gezonde plant aanprijkt worden deze virusdeeltjes door de speekselsecretie tijdens subfase II-1 losgemaakt en in een cel geïnjecteerd. Na enkele puncties is daarmee de voorraad uitgeput en heeft het individu zijn besmettelijkheid verloren (vandaar: non-persistent). Bovendien, als een infectieus juveniel individu vervelt - en ook de stiletten door nieuwe vervangt - gaat de besmettelijkheid verloren. Non-persistente virussen worden in de plant gebracht tijdens de eerste pd's, vaak al binnen tien seconden, dus in de epidermis- of buitenste mesofylcellen. Vandaar wordt het virus van cel tot cel verspreid via de plasmadesmata.



Figuur 3. TEM-reconstructie van een dwarsdoorsnede van een *Vicia faba*-blad met *Aphis fabae*-stiletten. Stiletweg met lege zijtakken (alleen speeksel, geel). Slechts een tak bevat de stiletten zelf (rode lijn). Stiletten (rood) eindigen in een zeefvatcel (floëmfase, groen), twee zijtakken eindigen in het xyleem (xylemfase, blauw). De feitelijk stiletweg (padfase) is uitsluitend intercellulair. Centraal is de vaatbundel te zien (bruine, groene en blauwe cellen).
TEM-reconstruction of a cross section of a Vicia faba-leaf penetrated by Aphis fabae-stylets. The track shows many empty branches (saliva only, yellow). The branch containing the stylets (red) ends in a phloem sieve element (phloem phase, green), two other branches end in the xylem (xylem phase, blue). The track formation (path phase) is exclusively intercellular. The vascular bundle is visible in the centre (brown, green and blue cells).

invloed van de zuurstof in de intercellulaire vloeistof (Miles 1999). Tussen twee opeenvolgende B pieken komt een signaal voor met een hogere frequentie en een lagere amplitude (figuur 2.). Dit reflecteert de mechanische stiletactiviteit om ruimte te maken in de celwand voor de speekseluitscheiding van de volgende B-golf. Op deze manier bestaat de padfase uit een cyclische activiteit van speekselsecretie en mechanische penetratie. Deze gang van zaken kon worden gereconstrueerd door stiletpenetraties door een (Parafilm™-)

membraan in vloeistof ('kunstfloëmsap') lichtmicroscopisch te observeren tijdens EPG-registratie. De cyclische uitscheiding en het geleren van speeksel in afwisseling met mechanische stiletactiviteit is dan microscopisch goed te zien en te correleren met EPG-golfvormen. Op basis van de gelijkvormigheid van het EPG in dieet (op dit punt) en plant is dan de plantsituatie af te leiden, gesteund door TEM-beelden van plantpenetraties: de stiletten penetreren tussen de cellen door via de secundaire celwand, onder continue afscheiding



Figuur 4. TEM-beeld van de intracellulaire positie van de stiletweg. De maxillaire stiletten (mx) omvatten het voedselkanaal (f) en het speekselkanaal (s), 'gezekerd' door haakvormige lijsten op de twee stiletten. De mandibulaire (md) kanalen bevatten neuronen voor mechanoreceptie bij de stiletpunt. In de padfase is gelerend speeksel (ss) afgezet tussen de twee mesofylcellen, waarvan de vacuolen (v1 en v2) en organellen te zien zijn. De stiletten penetreerden het secundaire celwandmateriaal, niet de middenlamel (pijlen).
Electron micrograph of the intercellular path position of the stylets. The maxillary stylets (mx) include the food canal (f) and the salivary canal (s), both locked by the hooked ridges of the two stylets. Each mandibular stylet (md) contains a neural canal for mechanoreception of the tip. During the path phase gelling sheath material (ss) was excreted between the two mesophyll cells, of which the vacuoles (v1 and v2) and organelles can be seen. The stylets penetrated the material of the secondary cell wall, not the central lamella (arrows).

van het gelerend speeksel dat zodoende de zogenaamde speekselschede rond de stiletten vormt (figuur 4). Naarmate de stiletweg vordert nemen de amplitudes van de B-golven af - zonder dat duidelijk is waarom - terwijl ertussen steeds meer onregelmatige signaalcomponenten verschijnen: golfvorm C, waarvan vooralsnog onbekend is wat ze vertegenwoordigen. In het EPG is vaak onduidelijk waar golfvorm A overgaat in B en waar B overgaat in C, zodat bij signaalanalyse deze drie golfvormen worden samengenomen als 'pad' (figuur 2, tabel 1).

Gedurende de padfase wordt het signaal regelmatig onderbroken door korte periodes met een 50-100 mV lagere potentiaal, de zogenaamde 'potential drops' (pd, figuur 2). De pd weerspiegelt een intracellulaire stiletpunctie van een plantencel (zie kader 1). Deze puncties hebben normaliter een duur van circa vijf seconden, waarna de stiletten zich weer uit de cel terugtrekken en hun intercellulaire weg vervolgen. In TEM-beelden zijn de sporen van puncties in bijna elke cel langs het stiletpad waargenomen. Sommige cellen worden zelfs vaker aangeprikt, floëmcellen in het bijzonder. Er wordt tijdens de puncties in cellen nauwelijks enig schedespeeksel uitgeschei-

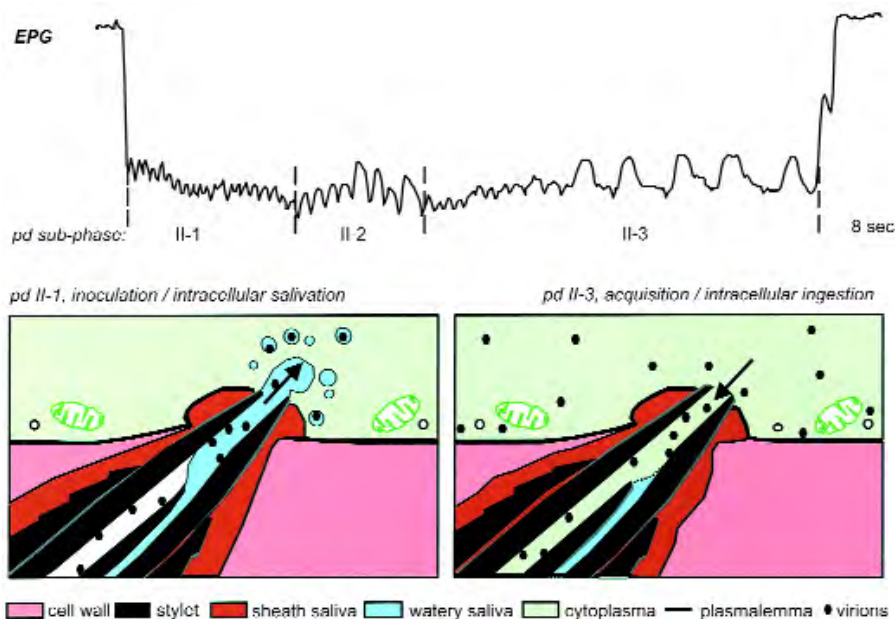
den, maar waarschijnlijk wel enig waterig niet-gelerend speeksel ten tijde van de eerste subfase in het EPG van de pd (figuur 5, subfase II-1, vakje 1 links; Martin *et al.* 1997). De complete pd-golfvorm heeft drie fasen waarvan alleen de hier genoemde fase II intracellulair is met zijn drie subfasen. Tijdens de derde subfase (figuur 5, II-3, vakje 1 rechts) neemt de bladluis een klein sapmonster op dat waarschijnlijk naar het smaakorgaan in de keelholte (pharynx) getransporteerd wordt (Wensler & Filshi, 1969) en mogelijk dient voor de waardplantselectie. Dat er opname en afgifte plaatsvindt bleek uit het feit dat de signalen van de pd-subfasen gerelateerd zijn met de transmissie van niet-persistente plantenvirussen (figuur 5, Martin *et al.* 1997). Gedurende subfase II-1 worden virusdeeltjes (virionen) in de cel geïnjecteerd met het waterig speeksel (virusinoculatie), terwijl gedurende subfase II-3 virionen worden opgenomen met het sapmonster (virusacquisitie; zie ook kader 2). Uit TEM-beelden bleek dat plantencellen de stiletpuntes goed overleven, hetgeen cruciaal is voor het ingebrachte virus.

De minimale tijdsduur van een padfase voorafgaand aan een xyleem- of floëmfase is 15-20 minuten. Dat is dus de tijd die minimaal nodig is om de afstand tussen epidermis en vaatbundelweefsels van kruidachtige planten te overbruggen. De werkelijke tijd is echter vaak langer omdat het bereiken van bijvoorbeeld een floëmvat lang niet altijd tot een floëmfase in het gedrag leidt, dat wil zeggen tot golfvormen E1 en E2. In het voorbeeld van figuur 3 werd het merendeel van de floëmvaten in de vaatbundel al aangeprikt vóór de eerste floëmfase, en die trad pas op ruim vier uur nadat de stiletten in de epidermis werden ingestoken en zeker vijf uur nadat de bladluis op deze waardplant werd gezet. De eerdere

zeefvatpuncties hebben in het EPG waarschijnlijk alleen een pd-golfvorm veroorzaakt maar geen floëmfasegolfvormen. Een floëmfase impliceert dus een zeefvatpositie van de stiletpunt, maar omgekeerd betekent niet elke zeefvatpositie een floëmfase in het penetratiegedrag. In het algemeen blijkt dat, afhankelijk van de waardplant-bladluiscombinatie, een gemiddelde duur van twee tot zeven uur nodig is voor het begin van de eerste floëmfase.

Xyleemfase

Een verrassende ontdekking was het bestaan van een xyleemfase (Spiller *et al.* 1990) bij bladluizen die verondersteld werden zich uitsluitend met floëmsap te voeden. De xyleemfase bestaat alleen uit de golfvorm G (figuur 2). Stylectomie tijdens G gevolgd door TEM liet een stiletpuntpositie in het xyleem zien. Gedurende de xyleemfase wordt het sap vermoedelijk actief opgezogen, omdat er meestal een negatieve hydrostatische druk heerst in de xyleemvaten die het gebruik van de zuigpomp noodzakelijk lijkt te maken. De zeer regelmatige hoge amplitude van de G-golfvorm wordt niet door de elektrische spieractiviteit zelf veroorzaakt maar door de daarmee samenhangende fluctuaties van de vloeistofstroom in het voedselkanaal, zogenaamde stromingspotentialen (emf-component). Bladluizen vertonen frequent 'xyleemdrinkgedrag' als ze enige tijd zonder plant en onder droge condities hebben verkeer, waarschijnlijk om hun waterbalans weer in evenwicht te brengen. Heeft een bladluis geen dorst, dan komen er geen xyleemfasen voor in de penetraties.



Figuur 5. 'Potential drop' met EPG-subfasen en hun relaties met speekselsecretie en sapopname, zoals bleek uit non-persistente virustransmissie. Subfase II-2 is onbekend. Voedsel- en speekselkanaal zijn bij de punt gefuseerd. In dit deel hechten virionen (virusdeeltjes) aan de stiletwand (rechts) of worden ze door speeksel losgemaakt (links).

The potential drop with EPG sub-phases and their corresponding salivation and ingestion relations as inferred from non-persistent virus transmission. Sub-phase II-2 is unknown. Food and saliva canals are fused near the stylet tip. In this area virions (virus particles) may attach to the stylet wall (right) or release by saliva (left).

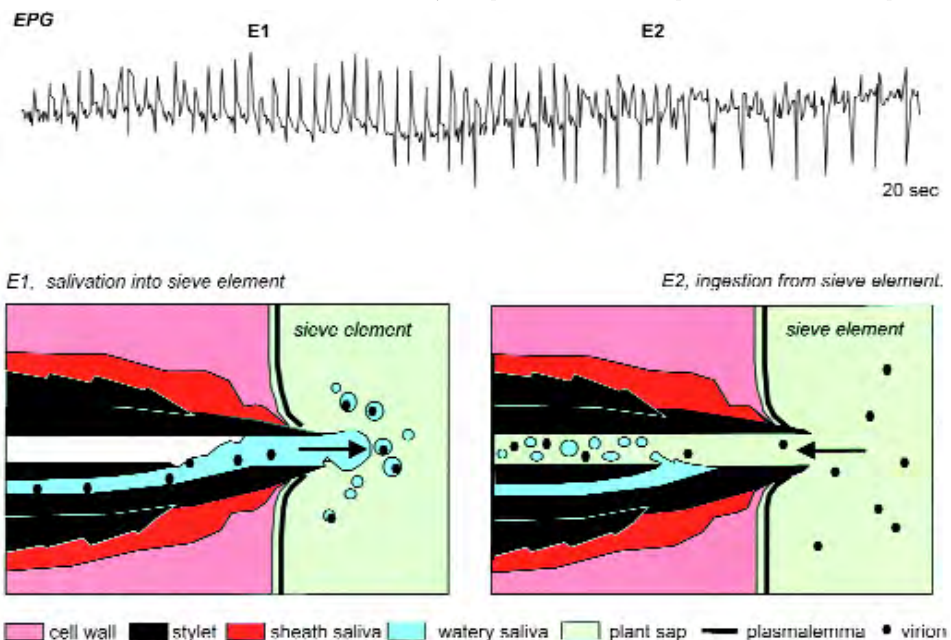
Floëmfase

Het uiteindelijke doel van de stiletpenetratie is de floëmvoeiding: sapopname uit de zeefvaten. Net als de xylemvaten bevinden de floëmvaten zich in de vaatbundel, maar in tegenstelling tot xylemvaten bestaan zeefvaten uit levende cellen terwijl een functioneel xylemvat geen levende protoplast bevat. Gedurende de floëmfase komen er twee EPG-golfvormen voor, eerst E1 en dan na circa een minuut golfvorm E2 (figuur 2, tweede floëmfase, en figuur 6); soms komt alleen E1 voor (zie figuur 2, eerste floëmfase). De huidige opvatting is dat tijdens E1 waterig speeksel in het zeefvat wordt geïnjecteerd, mogelijk om floëmwondreacties (coagulatie van eiwitten; Knoblauch & Van Bel 1998) tegen te gaan. Tijdens E2 vindt vervolgens onder constante toevoeging van waterig speeksel passieve floëmsapopname plaats. Continue floëmsapopname (E2) uit een enkel zeefvat is uren tot vele dagen (maximaal tien dagen) waargenomen. Een duur langer dan 10-15 minuten wordt vaak als criterium voor 'zeefvatacceptatie' gezien. Overigens begint een E1-periode altijd als een pd-golfvorm met subfasen II-1 en II-2. Alleen subfase II-3 is hierbij vaak minder duidelijk. Onbeantwoord blijft de vraag wat bepaalt of een zeefvatpunctie al dan niet van de initiële pd-activiteit overgaat in E1 en vervolgens al of niet overgaat in E2.

Open vragen en verder onderzoek

Aansluitend op het voorgaande zijn er nog veel vragen open over de penetratie-activiteit van bladluizen. Ondanks de vrij

gedetailleerde kennis die we nu verkregen hebben zijn er misschien zelfs wel meer vragen dan toen we van start gingen. Een oude vraag die nog steeds niet, of niet volledig, beantwoord kan worden is hoe bladluizen hun waardplant selecteren. Eigenlijk is dat ook bij de bijtende herbivore insecten vaak nog vrij vaag. Hoewel er voor sommige soorten 'sleutelprykkels' lijken te zijn in de vorm van de aanwezigheid van bepaalde secundaire plantenstoffen, lijkt voor andere soorten een subtiële combinatie van belang. Zo is er van veel Brassicaceae-specialisten bekend dat de aanwezigheid van zogenaamde glucosinolaten van belang is. Dat geldt ook voor de melige kooluis (*Brevicoryne brassicae* Linnaeus) (Gabrys & Tjallingii 2002). Het is echter niet uit te sluiten dat alleen sommige glucosinolaten daarbij een stimulerende, terwijl andere glucosinolaten mogelijk een inhiberende rol hebben. Met onze huidige kennis van het penetratiegedrag lijkt het duidelijk - maar niet 'bewezen' - dat de melige kooluis glucosinolaten proeft tijdens de sapopname gedurende de intracellulaire puncties (subfase II-3 van de pd). Of de glucosinolaten alleen tijdens deze intracellulaire puncties worden geproefd of dat er tijdens de padfase ook sapmonsters uit de intercellulaire vloeistof opgezogen worden om deze stoffen waar te nemen is niet bekend. Voor sapbemonstering tijdens golfvorm C zijn geen aanwijzingen, maar golfvorm C is in feite nog een grote hoop met onbekende elementen. Alleen golfvormen B, pd, en in mindere mate golfvorm A zijn duidelijke elementen in de padfase. Interessant in dit verband is dat in de padfase bij witte vlieg (Homoptera, Aleurodidae; Janssen *et al.* 1989) geen celpuncties (pd's) voorkomen. Sporadisch komen wel pd's voor met een



Figuur 6. Floëmfase-golfvormen E1 en E2 en hun relaties met speekselsecretie en sapopname, zoals bleek uit persistente virustransmissie. Tijdens E1 wordt speeksel met virionen (uit de speekselklier) in het zeefvat geïnjecteerd (links) omdat de klep (niet zichtbaar) in het voedselkanaal (pharynx) gesloten is. Tijdens E2 is de klep open zodat floëmsap met virionen het kanaal worden ingeperst door de hoge druk in het zeefvat (rechts). Het E2-speeksel gaat direct het kanaal in en komt niet in de plant.

Phloem phase wave forms E1 and E2 and their corresponding salivation and ingestion relations as inferred from persistent virus transmission. During E1 saliva with virions are injected into the sieve tube (left) because the cibarial valve (not visible) is closed. During E2 the valve is open, so that the sap with virions is forced into the stylet canal by the pressure in the sieve tube (right). The E2 saliva goes directly into the canal and will not reach the plant.

mogelijke floëemrelatie. Veel soorten witte vliegen zijn zeer monofaag (in tegenstelling tot onze plaagsoorten) en zullen hun waardplant waarschijnlijk al herkennen voor de floëemfase. Golfvorm C moet dus nog verder 'onder de loupe'.

Een andere 'klassieke' vraag is hoe bladluizen het floëem vinden. Er zijn allerlei gradiënten verondersteld die de stiletten maar hoeven te volgen om bij het floëem te komen, bijvoorbeeld een druk-, pH- of suikergradiënt. Het blijkt echter dat 'gradiënt' in de literatuur het meest wordt opgevat als een concentratieverschil tussen de inhoud van bijvoorbeeld mesofylcellen ten opzichte van vaatbundel- of zeefvatcellen. Er is dus niet een van cel tot cel geleidelijk veranderende concentratie, en daardoor dus niet een te volgen gradiënt. Met deze informatie zou voor bladluizen een plausibele alternatieve hypothese kunnen zijn dat het opsporen van het floëem een willekeurig proces is waarbij van elke cel langs de stiletweg door middel van een punctie wordt vastgesteld of het een floëemcel is of niet. De druk, de pH of het suikergehalte en dergelijke blijken na een celpunctie (pd). De initiële richting is altijd dezelfde: loodrecht op het bladoppervlak. Opnieuw verstoort de witte vlieg de redenatie echter, want deze insecten kunnen het floëem vinden zonder puncties. De vraag blijft dus vooralsnog onbeantwoord.

Plantenfysiologen hebben recent aangetoond dat coagulatie van floëemeiwitten binnen enkele minuten optreedt in een zeefvat dat mechanisch verwond raakt (Knoblauch & Van Bel 1998). Hierdoor raken de zeefplaten tussen de zeefvaten verstopt en vindt in de volgende uren en dagen een meer volledige afsluiting met callose plaats. De vraag is hoe bladluizen deze wondreacties kunnen voorkomen om zich ongehinderd met het floëemsap te voeden. Dat het E1-speeksel daarbij een rol zou kunnen spelen ligt voor de hand, de vraag is alleen hoe? Ook hier ligt nog een breed onderzoeksveld open.

Tenslotte een meer ecologisch probleem: bladluizen zijn onder andere schadelijk omdat ze groeistoornissen en 'toxische' effecten in de plant (kunnen) veroorzaken. Het blijkt steeds meer dat behalve groeiestoornissen er ook tal van andere effecten in de plant worden geïnduceerd: systemische resistentie, productie van vluchtige stoffen die in andere planten resistentie kunnen veroorzaken ('talking plants') of die natuurlijke vijanden van de belager aantrekken ('cry for help'). Het speeksel dat de bladluis in de plant injecteert lijkt hierbij een cruciale rol te spelen. Eenzelfde plant kan per bladluisoort totaal anders reageren. Uit onze huidige EPG-kennis blijkt dat er (ten minste) vier episoden van speekselsecretie zijn in het penetratiegedrag: 1) golfvorm B, gelerend speeksel intercellulair, 2) golfvorm pd (subfase II-1), waterig speeksel, intracellulair, 3) golfvorm E1, waterig speeksel in het zeefvat, en 4) golfvorm E2, waterig speeksel dat direct wordt opgenomen en met het floëemsap wordt gemengd. Bovendien bezitten bladluizen twee speekselklieren met elk een groot aantal verschillende uitscheidingscellen. Hoewel er steeds geavanceerdere technieken komen voor biochemisch onderzoek naar verschillende eiwitten zal het bemonsteren en ontrafelen van de verschillende speekselcomponenten niet eenvoudig zijn, maar wel essentieel om de diversiteit en specificiteit van de geïnduceerde plantreacties te kunnen begrijpen.

Literatuur

- Gabrys B. & Tjallingii WF 2002. The role of sinigrin in hostplant recognition by aphids during initial plant penetration. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104: 89-93.
- Janssen JAM, Tjallingii WF & Lenteren JC van 1989. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 52: 69-81.
- Knoblauch M & Van Bel AJE 1998. Sieve tubes in action. *The Plant Cell* 10: 35-50.
- Martin B, Collar JL, Tjallingii WF & Fereres A 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology* 78: 2701-2705.
- McLean DL & Kinsey MG 1964. A technique for electronically recording of aphid feeding and salivation. *Nature* 202: 1358-1359.
- Miles PW 1999. Aphid saliva. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 74: 41-85.
- Pickett J, Wadhams LJ, Woodcock CM & Hardy J 1992. The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology* 37: 67-90.
- Pollard DG 1973. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera: Aphidoidea): a review. *Bulletin of Entomological Research* 62: 631-714.
- Prado E & Tjallingii WF 1994. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72: 157-165.
- Prado E & Tjallingii WF 1997. Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 189-200.
- Spiller NJ, Koenders L & Tjallingii WF 1990. Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 55: 101-104.
- Tjallingii WF 1985. Stylet penetration activities by aphids. Thesis, Agricultural University, Wageningen.
- Tjallingii WF 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. In: *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Volume 2B (Minks AK & Harrewijn P eds): 95-108. Elsevier.
- Tjallingii WF 1990. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. In: *Aphid-plant genotype interactions*. (Campbell RK & Eikenbary RD eds): 89-99. Elsevier.
- Tjallingii WF 2000. Comparison of AC and DC systems for electronic monitoring of stylet penetration activities by homopterans. In: *Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior* (Walker GP & Backus EA eds): 41-69. Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America.
- Tjallingii WF & Hogen Esch T 1993. Fine structure of the stylet route in plant tissues by some aphids. *Physiological Entomology* 18: 317-328.
- Wensler RJD & Filshi KB 1969. Gustatory sense organs in the food canal of aphids. *Journal of Morphology* 129: 473-492.

Geaccepteerd 14 april 2003.

Summary

Stylet penetration by aphids - electrical penetration graph signals from green depths

Stylet penetration by aphids can be studied well by the electrical penetration graph (EPG) technique, a recording system which incorporates both plant and insect in an electrical circuit. It appears that especially the insect activities characteristic of plant penetration as well as the tissue positions of the aphid's stylets in the plant are measured by the EPG-system. Only the movement limitations of the insect, by tethering it to the thin electrode, influence the behaviour somewhat. A large number of details of plant-aphid interactions during stylet penetration has been elucidated by EPG-studies, but this has possibly aroused an even larger number of questions on what goes on in the depth of the plant tissues.