



The Salivary Proteome of Tetranychus Urticae: Key to its Polyphagous Nature?
W.S.A. Jonckheere

SAMENVATTING

HET SPEEKSELPROTEOOM VAN *TETRANYCHUS URTICAE*: SLEUTEL TOT Z'N POLYFAGE AARD?

De spintmijt *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) is een extreem polyfage herbivoor. Deze minuscule landbouwplaag werd reeds waargenomen op zo'n 1100 verschillende planten, behorend tot wel 140 families. Over het algemeen zijn herbivoren aangepast aan een beperkt aantal plantensoorten. Dit komt doordat deze primaire producenten zich met een gans arsenaal aan verdedigingsmechanismen verweren tegen belagers (**Hoofdstuk 1**). Naast de productie van gifstoffen en het activeren van gecontroleerde celdood kunnen ook alarmsignalen worden afgegeven door de plant die natuurlijke vijanden van de herbivoor aantrekken. *Tetranychus urticae* blijkt echter uitstekend in staat te zijn om diverse plantaardige gifstoffen onschadelijk te maken. Diezelfde mechanismen spelen ook een rol bij het ontstaan van resistentie tegen synthetische gifstoffen, ingezet ter bestrijding van de spintmijt (acariciden). Dat deze detoxificatie-mechanismen waarschijnlijk niet de enige aanpassing zijn die aan de basis liggen van het brede gastheerspectrum van *T. urticae* blijkt uit het feit dat spintmijten ook in staat zijn de afweerrespons van planten te onderdrukken. Met name geïnjecteerde componenten uit het speeksel zouden hier verantwoordelijk voor zijn. Het ondermijnen van de planten-afweerrespons wordt ook bij pathogenen, nematoden en herbivore insecten teruggevonden. De componenten worden 'effectoren' genoemd, en omvatten alle eiwitten of kleine moleculen die door pathogenen of herbivoren gesecreteerd worden en die de functie of structuur van de gastheercel wijzigen. De centrale onderzoeksvraag van deze doctoraatsstudie luidt dan ook als volgt: 'Welke rol spelen de speekselcomponenten van *T. urticae*, in het bijzonder effectoren, tijdens de interactie met de gastheerplanten?'

In **Hoofdstuk 2** voorspelden we effectoren van *T. urticae* en *T. evansi* aan de hand van een strategie die gebaseerd is op een bio-informatica procedure gekoppeld aan expressie analyses in geïsoleerde mijten-achterlijven (qPCR). Enkele geïdentificeerde eiwitten bleken een effect te hebben op de afweerrespons van de waardplant en op het reproductief succes van de mijten die op de plant voeden.

In **Hoofdstuk 3** werd het gesecreteerde speeksel van *T. urticae* lijnen, aangepast aan verschillende planten, onderzocht door middel van nano-LC-MS/MS. De lijst met geïdentificeerde eiwitten werd vergeleken met expressie-data van de kop-regio, die de speekselklieren bevat. Op deze manier konden contaminerende eiwitten geïdentificeerd worden. De lijst, die een 90-tal eiwitten omvat, bevat verschillende vermoedelijke verterings- en detoxificatie-enzymen, en bestaat verder hoofdzakelijk uit eiwitten waarover niets geweten is. Vervolgens werd de plaats van expressie van enkele genen coderend voor kandidaat-speeksel-eiwitten bepaald aan de hand van *in situ* hybridisaties. Het merendeel van de geteste genen bleek inderdaad in de speekselklieren tot expressie te komen, en een functieverdeling

tussen twee types speekselklieren werd waargenomen. Het beschikbaar stellen van de lijst van speekselwitten kan op termijn aanleiding geven tot de ontwikkeling van resistente gewassen vermits hiermee sleutelementen in de afweer van planten blootgelegd kunnen worden.

Uit de analyses in Hoofdstuk 3 kon worden waargenomen dat de productie van sommige speekselwitten sterk afhankelijk is van de gastheerplant waaraan *T. urticae* is aangepast. Dit werd in **Hoofdstuk 4** verder statistisch onderbouwd en bevestigd door expressedata (micro-array) van de mijten aangepast aan de verschillende planten. De ontdekking van de gastheer-afhankelijke expressie van sommige genen coderend voor speekselwitten is een eerste stap richting functionele validatie aangezien effectoren vaak een zeer specifieke werking hebben. Verder werd de speekselsamenstelling van de nauw verwante soorten *T. evansi*, specialist op Solanaceae, en *T. lintearius*, specialist op *Ulex*, voorspeld aan de hand van de geïdentificeerde *T. urticae* eiwitten (OrthoMCL analyse). Door de speekselsamenstelling van deze mijten met een sterk verschillende gastheerspectrum te vergelijken konden we adaptaties aan polyfagie waarnemen.

Het speeksel van *T. urticae* werd opnieuw geanalyseerd met nano-LC-MS/MS, maar deze keer lag de focus op endogene peptiden. Eén familie van spintmijt speekselwitten bleek uitermate interessant voor verder onderzoek: de ‘Secreted HOst-responsive protein of Tetranychidae’ (SHOT) familie. Deze familie blijkt namelijk sterk geëxpandeerd te zijn in *T. urticae*, terwijl gelijkaardige eiwitten bij geen enkel ander organisme voorkomen, met uitzondering van verwante spintmijtensoorten. Bovendien was de expressie van sommige van de SHOT leden sterk afhankelijk van de gastheerplant waarmee *T. urticae* zich voedt. Een extreme inductie na bepaalde gastheertransfers was reeds binnen enkele uren duidelijk waarneembaar. Deze familie werd in **Hoofdstuk 5** besproken, terwijl ook het voorkomen van SHOT eiwitten in verwante spintmijten onderzocht werd. Ook hier kwam een duidelijke link met het gastheer-repertoire naar voren.

In **Hoofdstuk 6** worden de bevindingen uit het onderzoek met elkaar gelinkt en gezamenlijk geïnterpreteerd vanuit de levenswijze van *T. urticae*. Tevens wordt het ontwikkelen van spintmijt-resistente gewassen, gebruik makend van (gemodificeerde) R en S genen besproken.