



**UvA-DARE (Digital Academic Repository)**

**The salivary proteome of Tetranychus urticae**

Jonckheere, W.S.A.

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*

Jonckheere, W. S. A. (2018). The salivary proteome of Tetranychus urticae: Key to its polyphagous nature?

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <http://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Summary

## THE SALIVARY PROTEOME OF *TETRANYCHUS URTICAE*: KEY TO ITS POLYPHAGOUS NATURE?

The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) is an extremely polyphagous herbivore. This tiny crop pest has been recorded on over 1100 host plant species belonging to 140 different families, while herbivores are generally specialized in feeding on a limited number of hosts. This is due to elaborate plant defenses, which may be diverse and lineage-specific and which subvert the performance of attackers (**Chapter 1**). Next to the production of toxic components or the activation of a controlled cell death, plants can produce alarm signals which attract the natural enemies of the herbivore. *Tetranychus urticae*, however, appears to be capable to deal with many of the plant secondary metabolites. The same mechanisms also predisposed spider mites to develop resistance against several acaricides. Detoxification mechanisms are not the only adaptation at the basis of the broad host range of *T. urticae*. Indeed, it has been shown that spider mites are able to interfere with plant defense activation. Such defense manipulation has also been described for pathogens, nematodes and herbivorous insects and is mediated by so-called ‘effector’ proteins. These include all proteins or small molecules which are secreted by pathogens or herbivores and which alter the structure or function of the host cell. The aim of this PhD study is to investigate the role of the salivary components of *T. urticae*, notably effectors, during the interaction with its many host plants.

In **Chapter 2**, we predicted the effector composition of *T. urticae* and *T. evansi* secretions using a strategy based on a bio-informatics pipeline, coupled to a gnathosoma-specific expression analysis (qPCR). Some of the identified proteins indeed had an effect on the defense response of the host plant and on spider mite performance.

In **Chapter 3**, the secreted saliva of *T. urticae* lines adapted to various host plants was investigated using nano-LC-MS/MS (proteomics analysis). The list of identified proteins was compared with RNAseq data of mite proterosoma, which is the head region harboring the salivary glands. As such, some contaminating proteins could be identified. The obtained list of about 90 proteins comprises several putative digestive enzymes and, more importantly, many proteins which do not show resemblance to other known proteins. To verify the expression localization of some candidate salivary

protein genes, whole-mount *in situ* hybridizations were performed. Most of the tested genes were indeed expressed in the salivary glands, and a ‘division of labor’ between two different salivary gland types was evident. The elucidation of the salivary protein repertoire can help in the development of spider mite-resistant crops since they are critical for the identification of plant resistance and susceptibility genes.

The proteomics analysis in Chapter 3 revealed that the production of some salivary proteins is highly dependent on the host plant to which *T. urticae* is adapted. This observation was further substantiated in **Chapter 4** by complementing the host specific proteomics data with gene expression data (micro-array) of the mite lines adapted to the different host plants. The discovery of host-dependent expression of some salivary protein genes is an important step in functional validation since effectors often have a highly specific mode of action. In addition, the occurrence of the identified *T. urticae* salivary proteins in the proteomes of the related species *T. evansi* and *T. lintearius* was studied using an OrthoMCL analysis. These two mite species are specialists on Solanaceae and *Ulex* respectively. By comparing the (predicted) salivary protein composition of these three species with a highly different number of potential hosts, we hoped to discover adaptations to polyphagy.

*Tetranychus urticae* secretions were again analyzed using nano-LC-MS/MS, but this time the focus was on endogenous peptides present in the saliva. One family of spider mite specific salivary proteins appeared to be of high interest and was subjected to further research: the ‘Secreted HOst-responsive protein of Tetranychidae’ (SHOT) family. This family is expanded in *T. urticae*, while homologs do not occur in other organisms except for related spider mite species. In addition, the expression of some *SHOT* members was highly dependent on the host plant on which *T. urticae* had been feeding. Induction was noticeable within a few hours after host plant transfer. This salivary protein family is discussed in **Chapter 5**, while also their occurrence in other mite species was investigated and linked to the host range of these species.

In **Chapter 6**, the findings from the other chapters are linked with each other and discussed in the context of the biology of *T. urticae*. In addition, the development of mite-resistant crops, using (modified) R and S genes, is discussed.

# 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 landbouwplaaag 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-speekseleiwitten 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 speekseleiwitten kan op termijn aanleiding geven tot de ontwikkeling van resistente gewassen vermits hiermee sleutelelementen in de afweer van planten blootgelegd kunnen worden.

Uit de analyses in Hoofdstuk 3 kon worden waargenomen dat de productie van sommige speekseleiwitten 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 gastheerafhankelijke expressie van sommige genen coderend voor speekseleiwitten 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 speekseleiwitten 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.

## Author contributions

### **Chapter 2 - Salivary proteins of spider mites suppress defenses in *Nicotiana benthamiana* and promote mite reproduction**

*Villarroel, C.A., Jonckheere, W., Alba, J.M., Glas, J.J., Dermauw, W., Haring, M.A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Kant, M.R.*

CAV, WD, RCS & MRK designed research; CAV, WJ, JMA & JMG performed research; CAV & JMA analyzed data; CAV, RCS & MRK wrote the paper; CAV, WJ, JMA, JMG, WD, MAH, TV, RCS & MRK revised the article.

### **Chapter 3 – The salivary protein repertoire of *Tetranychus urticae***

*Jonckheere, W., Dermauw, W., Zhurov, V., Wybouw, N., Van den Bulcke, J., Villaroel, C., Greenhalgh, R., Grbic, M., Schuurink, R.C., Tirry, L., Baggerman, G., Clark, R.M., Kant, M.R., Vanholme, B., Menschaert, G., Van Leeuwen, T.*

WJ, WD & TV designed research; WJ, WD, VZ, JV & GB performed research; CAV, MG, RCS, LT, RMC, MRK & BV contributed reagents or analytic tools; WJ, WD, NW, RG, GM & TV analyzed data; WJ, WD & TV wrote the paper; LT, RMC, MRK & BV revised the article.

### **Chapter 4 – A link between host plant range and the salivary protein repertoire of spider mites**

*Jonckheere, W., Dermauw, W., Zhurov, V., Wybouw, N., Van den Bulcke, J., Villaroel, C., Greenhalgh, R., Grbic, M., Schuurink, R.C., Tirry, L., Baggerman, G., Clark, R.M., Kant, M.R., Vanholme, B., Menschaert, G., Van Leeuwen, T.*

WJ, WD & TV designed research; WJ, WD, VZ, JV & GB performed research; CAV, MG, RCS, LT, RMC, MRK & BV contributed reagents or analytic tools; WJ, WD, NW, RG, GM & TV analyzed data; WJ, WD & TV wrote the paper; LT, RMC, MRK & BV revised the article.

### **Chapter 5 – A putative salivary effector family of *Tetranychus urticae* shows host plant dependent expression**

*Jonckheere, W., Dermauw, W., Khalighi, M., Pavlidi, N., Reubens, W., Baggerman, G., Tirry, L., Menschaert, G., Kant, M.R., Vanholme, B., Van Leeuwen, T.*

WJ, WD & TV designed research; WJ, WD, MK, WR, NP & GB performed research; WJ, WD & GM analyzed data; WJ, WD & TV wrote the paper, with input from LT, MRK & BV.

# Biography

Wim S.A. Jonckheere was born on the 23rd of July 1987, in Bruges, Belgium. In 2005, he obtained his secondary school certificate (Sint-Franciscus-Xaveriusinstituut, Bruges) and enrolled at Ghent University to study Biology. Wim received his Master of Science degree (Biology; Evolution & Functional Biology) in 2010 and started a Master of Science in Environmental Sanitation and Management. After this study in 2011, he began a 3-year PhD project at the Agrozoology Lab of the Faculty of Bioscience Engineering of Ghent University under the supervision of his promoters Prof. dr. ir. Luc Tirry and dr. ir. Thomas Van Leeuwen. In 2014, an additional funding from the Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (University of Amsterdam) was obtained to finalize this PhD project. In 2015, Wim was accepted to work on a project on biological control using Vietnamese predatory mites.



## PUBLICATIONS

### Publications in peer-reviewed international journals

- Kant, M. R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J., Villarroel, C. A., Ataide, L. M. S., Dermauw, W., Glas, J. J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R. C., Sabelis, M. W., and Alba, J. M. (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Annals of Botany* 115, 1015-1051. (2015 IF: 3.982)
- Villarroel, C.A., Jonckheere, W., Alba, J.M., Glas, J.J., Dermauw, W., Haring, M.A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Kant, M.R. (2016) Salivary proteins of spider mites suppress defenses in *Nicotiana benthamiana* and promote mite reproduction. *The Plant Journal* 86, 119-131. (2016 IF: 5.901)
- Jonckheere, W.\*, Dermauw, W.\*, Zhurov, V., Wybouw, N., Van den Bulcke, J., Villarroel, C., Greenhalgh, R., Grbic, M., Schuurink, R.C., Tirry, L., Baggerman, G., Clark, R.M., Kant, M.R., Vanholme, B., Menschaert, G., Van Leeuwen, T. (2016) The salivary protein repertoire of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*: a quest for effectors. *Molecular & Cellular Proteomics* 15, 3594-1613. (2016 IF: 6.540)
- Jonckheere, W.\*, Dermauw, W.\*, Khalighi, M., Pavlidi, N., Reubens, W., Baggerman, G., Tirry, L., Menschaert, G., Kant, M.R., Vanholme, B., Van Leeuwen, T. (2017) A gene family coding for salivary proteins (SHOT) of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae* exhibits fast host-dependent transcriptional plasticity. *MPMI*, in press, <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0139-R> (2016 IF: 4.332)

\*Shared first author

### Conference contributions

- Jonckheere, W., Dermauw, W., Zhurov, V., Wybouw, N., Van den Bulcke, J., Tirry, L., Baggerman, G., Clark, R.M., Kant, M.R., Vanholme, B., Menschaert, G., Van Leeuwen, T. The salivary protein repertoire of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*: a quest for effectors. *Oral presentation at the Belgian Proteomics Association (BePA) conference, Ghent, 2016.*

## Dankwoord – Acknowledgements

Een doctoraat schrijf je natuurlijk niet in je eentje. Tijdens mijn onderzoek heb ik kunnen rekenen op de hulp en steun van heel wat mensen. Zij leverden bijdragen die varieerden van het regelen van officiële zaken, over het analyseren van resultaten, tot het simpelweg aanhoren van frustraties.

Bij de aanvang van dit dankwoord zou ik graag mijn promotoren Peter van Tienderen en Luc Tirry bedanken voor het goeie verloop van mijn doctoraat. Ook wens ik mijn co-promotor Thomas Van Leeuwen te bedanken voor het aanbieden van het onderwerp, de begeleiding en het vertrouwen. Dankzij u heb ik een variatie aan technieken onder de knie gekregen en ben ik (hopelijk) gegroeid als onderzoeker. Verder was een goeie afloop van dit doctoraat niet mogelijk geweest zonder Wannes Dermauw. Heel erg bedankt Wannes, jouw vaardigheden in dataverwerking zijn niet te evenaren en zonder jou zou dit boekje vooral lege tabellen en lelijke figuren bevatten.

Tijdens mijn onderzoek heb ik de mogelijkheid gekregen in verschillende laboratoria te werken. Het grootste deel van mijn tijd heb ik doorgebracht aan de Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen te Gent. Hier kon ik steeds rekenen op het fantastische technische personeel. Bjorn, Didier, Leen, Rik en Stephanie, bedankt voor alles wat jullie gedaan hebben! De eerste twee jaar van mijn doctoraat was ik ook geregeld terug te vinden in het VIB te Zwijnaarde. Hier kon ik steeds rekenen op Bartel Vanholme, die mij onder andere de technische details in verband met kloneren en transformeren heeft bijgebracht. Ook werden de teksten kritisch door Bartel nagelezen. Merci Bartel! I also spent a few weeks at The University of Crete (Rethymnon, Greece). I would like to thank Frederic Verret for the help with peptide infiltration and Evangelia Morou for offering me a place to stay. Next, I also went to The University of Western Ontario (London, Canada) for 2 weeks, and I would like to thank Vladimir Zhurov for teaching me how to perform whole-mount *in situ* hybridizations, and Vojislava and Miodrag Grbic for the accommodation. Vlad, you were a great teacher, and the *in situ*'s proved to be of great value for my research project. The last year of my thesis was in collaboration with the University of Amsterdam. I would like to thank Bart Schimmel for the excellent guidance during the transient transformation assays. Further, I would like to thank Carlos Villarroel and Juan Alba for additional help in the lab. My sincere thanks also go to Merijn Kant for pro-

viding me the opportunity to work in Amsterdam and for the useful comments on the research project.

Uiteraard mag ook mijn masterthesis-student, Wim Reubens, niet ontbreken in dit dankwoord. ‘Junior’, je hulp bij heel wat experimenten is een meerwaarde geweest voor de gepubliceerde papers en dit doctoraat.

Verder bedank ik graag mijn collega’s van het mijten-labo. Arash, Astrid, Catherine, Nicky, Peter, Sabina, Simon en Wenxin, fijn dat jullie erbij waren en bedankt voor de goeie samenwerking. Daarnaast was er nog een speciale rol weggelegd voor mijn bureaugenoten. Freya, Hamshou, Jinzhi, Maxime, Mona, Nathaly en Simon, bedankt dat ik regelmatig eens mijn hart bij jullie kon luchten, en we hebben toch regelmatig eens goed gelachen. Ook wens ik graag de ‘lunch-collega’s’ te bedanken. Zelf ben ik niet zo’n grote babbelaar, maar ik heb altijd met veel plezier met jullie aan tafel gezeten. Ik zal jullie allemaal missen.

Vervolgens wens ik graag mijn goeie vriend Thomas Vannecke nog te bedanken. Onze levens liepen verontrustend gelijkaardig, maar toen het beëindigen van je doctoraat gepaard ging met de komst van een baby werd het toch stilaan tijd om deze symmetrie te verbreken. Thomas, merci voor de babbels en de plezante tijden. Fijn dat je je in mijn geboortedorp gevestigd hebt, draag er zorg voor!

Tot slot wil ik ook graag mijn familie en vriendin Morgane bedanken voor de steun en de aanmoedigingen tijdens de afgelopen jaren.

*Wim Jonckheere*

Gent

Juni 2017