



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

The role of plant susceptibility genes in mite-plant interactions

Blaazer, C.J.H.

Publication date
2021

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Blaazer, C. J. H. (2021). *The role of plant susceptibility genes in mite-plant interactions*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

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: <https://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

Samenvatting

**Author contributions
and project funding**

Author addresses

Acknowledgements

About the Author

SUMMARY (ENGLISH)

Spider mites are a pest on many important crops because they are masters in developing resistance to pesticides as well as natural plant defences. They also secrete salivary proteins into the plant during feeding some of which make the host plant more suitable as food by interfering with their defences. In this thesis I selected one of the main proteins of spider mite saliva, a protein of unknown function called SHOT2b, to investigate its effect on the plant and via the plant on the mite. Using a technique called Yeast-2-Hybrid I identified several plant proteins that interact with SHOT2b and these appeared to mainly belong to the MUT9-LIKE KINASE (MLK) family. In the model plant *Arabidopsis thaliana* the MLK family consists of four kinases. Kinases are a large group of proteins that activate (sometimes inactivate) other proteins via phosphorylation and the MLK family of *A. thaliana* has important roles in primary and secondary processes, e.g. they are involved in the regulation of light perception. I focussed my research on one of these proteins in *A. thaliana*, called MLK4, because I observed that this particular protein renders the plant susceptible to spider mites i.e. spider mites upregulate the expression of *MLK4* whereas on *MLK4* knock-out (KO) mutant plant spider mites only produce half of their normal amount of offspring. Therefore, we consider *MLK4* to take effect as a so-called Susceptibility gene/protein (S-gene/protein) of *A. thaliana*, since its presence makes the plant more susceptible to spider mites. This is the first time that a plant protein that facilitates spider mites has been identified. After my discovery of *MLK4* as S-gene and as plant target of the mite's SHOT2b, my research project focussed mainly on two general questions: (1) how does *MLK4* cause susceptibility to spider mites and (2) what is the role of *SHOT2b* in this process? To address these questions, I worked with wild type Col-0 and *mlk4* KO *A. thaliana* plants and of these plant genotypes I also created transgenic lines equipped with an artificially inducible *SHOT2b* gene. First, I performed general response screens on these plant lines, including lines infested with mites, using transcriptomics, proteomics, phosphoproteomics and metabolomics. Spider mite infestation induced marked changes at all these levels in the plant's primary and secondary chemistry in response to spider mites. However, the differences between normal plants to *mlk4* plants with or without *SHOT2b* expression were rather minor and especially pointed towards differences at the level of glucosinolate metabolism. Glucosinolates are a family of toxins that protect the plant against mainly herbivores and some pathogens. Glucosinolates are activated by the enzyme myrosinase, and in turn form highly reactive nitriles and cyanides, that upon ingestion can ultimately lead to increased mortality. Dedicated assessment of glucosinolate levels in our plant lines suggests



that the interaction between MLK4 and SHOT2b may reduce the levels of a subset of aliphatic glucosinolates which could explain why mites perform so poorly on *mlk4* mutant plants and we hypothesized that SHOT2b may stabilize MLK4. Furthermore, we observed that *mlk4* plants despite being fairly resistant to spider mites also have a deleterious root phenotype and are subject to greatly delayed flowering (data not shown). Hence, we reasoned that for making plants more resistant to spider mites by disabling the MLK4 – SHOT2b interaction, a KO mutation of *MLK4* is undesirable but would require *MLK4* alleles with normal functionality yet that do not interact with SHOT2b. Therefore, we created a yeast library of MLK4 proteins with random single non-synonymous SNPs and searched for mutant versions not interacting with SHOT2b yet could have a normal functionality. The latter we were unable to confirm within the time frame of this PhD project but we identified several single amino acid changes that are strong candidates for obtaining “SHOT2b -resistant” MLK4 alleles and which could possibly be applied to make crops more resistant to spider mites. From the fundamental perspective of my research an important question is to which extent there is reason to believe that the SHOT2b – MLK4 interaction has naturally evolved in the interaction between spider mites and *A. thaliana*. Two important reasons for asking this question are the fact that spider mites are not often found on crucifers while the expression of *SHOT2b* ceases in the second generation of spider mites on *A. thaliana* as well alternative hosts such as tomato. Although this downregulation may reflect a physiological trade off with activation of the mite’s detoxification machinery it may also indicate that the interaction between SHOT2b and MLK4 does actually not play a role of great importance in *A. thaliana* – spider mite interaction. We explored therefore also the interactions between SHOT paralogs, some of which not being downregulated on plants like tomato and *A. thaliana*, and MLK orthologs in different plant species i.e. tomato and bean. These data indicate that the SHOT – MLK interaction is not limited to SHOT2b / MLK4 and thus may be relevant for the interaction between spider mites and other plant species as well. This would emphasize that, on the one hand, *A. thaliana* clearly is a very suitable model plant for exploring the mechanistic aspects of the interplay between herbivore effectors and plant targets yet not automatically for translating such findings to the level of ecophysiology and that of co-evolutionary arms races, on the other. Taken together, I discovered a plant S-gene that facilitates spider mites and possibly is hijacked by the mite’s SHOT effectors to downregulate plant defences. Expanding this research line to other (crop) plants in the future may reveal novel opportunities for resistance breeding against herbivorous pests

SAMENVATTING

Planten vormen de fundering van het hele voedselsysteem: niet alleen worden wij gevoed door groente- en fruitgewassen, maar het (pluim)vee eet ook van planten zoals mais en soya. Het is een grote uitdaging om onszelf en de wereld te blijven voeden aangezien er op dit moment nog veel voedseltekorten zijn. Door het veranderende klimaat zullen deze tekorten nog verder oplopen. Zo wordt er verwacht dat er de komende jaren meer plagen zullen zijn van herbivoren, zoals sprinkhanen, bladluizen en mijten. Planten hebben een natuurlijk afweersysteem dat zich verdedigd tegen plagen, maar door jarenlange selectie is diversiteit verloren gaan waardoor planten minder goed beschermd zijn (voor meer informatie, zie hoofdstuk 1 van deze thesis). Een van de plagen die zowel in het veld als in de kassen voorkomt, zijn de spintmijten. Omdat spintmijten erg klein zijn, worden ze lastig gedetecteerd en door hun snelle populatiegroei is het snel te laat wanneer ze wel worden opgemerkt. Daarnaast onderdrukken spintmijten het natuurlijke afweersysteem van planten doordat ze in hun speeksel eiwitten hebben die een interactie aangaat met eiwitten in de plant. Die planten-eiwitten kunnen gemanipuleerd worden door de mijten-eiwitten, waardoor de plant nog vatbaarder wordt. Tijdens dit promotie onderzoek heb ik zo'n mijten-eiwit onderzocht: SHOT2b. Dit eiwit gaat een interactie aan met een belangrijk planten-eiwit, MLK4, dat o.a. betrokken is bij het reguleren van licht responses en bloei van de plant *Arabidopsis thaliana*: een modelplant in de biologie (hoofdstuk 2 van deze thesis). Mijten leggen veel minder eitjes op planten waar MLK4 expressie afwezig is. Daarom concluderen we dat mijten een correcte werking van MLK4 nodig hebben om te gedijen op *Arabidopsis*. Ondanks dat MLK4 de planten vatbaarder maakt voor mijten, is het gen wel echt nodig omdat planten anders niet op tijd bloeien. Daarnaast heb ik gevonden dat planten hun genexpressie grootschalig aanpassen wanneer mijten de plant infesteren (hoofdstuk 3 van deze thesis), en veel toxines gaan produceren, met name glucosinolaten (hoofdstuk 3 en 4 van deze thesis). Deze gifstoffen hebben een karakteristieke geur en smaak, en komen voornamelijk voor in kolen. Onderzoek van andere wetenschappers heeft ook aangetoond dat deze stoffen ook erg nadelig zijn voor mijten. In hoofdstuk 4 heb ik de glucosinolaten in de plant gemeten, en heb ik gevonden dat het mijten-eiwit SHOT2b de productie van sommige van deze gifstoffen tot een halt brengt. Dit kan SHOT2b alleen doen wanneer MLK4 aanwezig is. Dit verklaart waarom mijten veel minder eitjes leggen op planten die MLK4 niet tot expressie brengen, omdat dan SHOT2b niet de glucosinolaat productie kan remmen vanwege de afwezigheid van MLK4. Dit beargumenteer ik in het laatste hoofdstuk van deze thesis (hoofdstuk 5). Tot slot heb ik gerichte mutaties in

het gen van *MLK4* aangebracht zodat de interactie met *SHOT2b* wordt doorbroken. Deze nieuwe methode van resistentie herstel van planten zou o.a. kunnen worden toegepast in zaadveredeling



AUTHOR CONTRIBUTIONS AND PROJECT FUNDING

Chapter 1 – General introduction

M.R. Kant and B.C.J. Schimmel conceptualized the manuscript. C.J.H. Blaazer, E.Villacis-Perèz, and R. Chafi drafted the manuscript. T. Van Leeuwen, M.R. Kant, P.H. van Tienderen, B.C.J. Schimmel supervised the writing, critically revised the manuscript, and contributed to its final version. C.J.H. Blaazer, E.Villacis-Perèz, R. Chafi and B.C.J.Schimmel designed figures

Chapter 2 - Identification of genes that render plants susceptible to spider mites

C.J.H. Blaazer, J.M. Alba-Cano and M.R. Kant conceptualized the manuscript. C.J.H. Blaazer drafted the manuscript. M.R. Kant, W. Dermauw, P.H. van Tienderen supervised the writing, critically revised the manuscript, and contributed to its final version.

Chapter 3 - *MLK4* is a regulator of glucosinolate metabolism in *Arabidopsis* plants

C.J.H. Blaazer, E. Jongepier and M.R. Kant conceptualized the manuscript. J. Liu, J.M. Alba-Cano and L. Dong contributed to the experimental work. C.J.H. Blaazer drafted the manuscript. E. Jongepier, M.R. Kant, W. Dermauw, P.H. van Tienderen supervised the writing, critically revised the manuscript, and contributed to its final version.

Chapter 4 - *SHOT2b* enhances the suppression of sulfinylalkyl glucosinolates via a direct interaction with spider mite-induced *MLK4* in *Arabidopsis*

C.J.H. Blaazer and M.R. Kant conceptualized the manuscript. E. Jongepier, J.M. Alba-Cano and M. Dullaart contributed to the experimental work. C.J.H. Blaazer drafted the manuscript. M.R. Kant, W. Dermauw, P.H. van Tienderen supervised the writing, critically revised the manuscript, and contributed to its final version.

Chapter 5 – General Discussion

C.J.H. Blaazer conceptualized the manuscript. C. Rooker and J.M. Alba-Cano contributed to the experimental work. C.J.H. Blaazer drafted the manuscript. M.R. Kant, W. Dermauw, P.H. van Tienderen supervised the writing, made suggestions for revision, and contributed to its final version.

Project funding

Dutch Research Council (NWO) Technology Foundation STW/VIDI 13492



AUTHOR ADDRESSES

*Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam,
Science Park 904, 1098 XH, Amsterdam, The Netherlands*
C.J.H.Blaazer, R.Chafi, E. Villacis-Perez, E. Jongepier, J.M.Alba-Cano, L.Dong,
M.R.Kant.

*Institute of Plant Sciences, University of Bern, Altenbergrain 21, 3013 Bern,
Switzerland*
B.C.J.Schimmel

*Wageningen Plant Research, Wageningen University and Research,
Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands*
R.C.H.de Vos

*Faculty of Bioscience Engineering, Department of Plants and Crops, Gent University,
Coupure Links 653, gebouw A, 9000 Gent, Belgium*
T. Van Leeuwen

*Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek,
Burgemeester Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke, Belgium*
W. Dermauw



ACKNOWLEDGEMENTS

Allereerst wil ik Merijn bedanken. Merijn, bedankt voor je vertrouwen, je geduld, je feedback en je ideeën. Ik ben je heel erg dankbaar voor je concrete advies: wanneer ik je kantoor verliet, was toch alles even wat duidelijker. Ik heb altijd gewaardeerd dat je me de vrijheid gaf om dingen te onderzoeken en dat je me eigenlijk altijd daarin hebt gesteund. Daarnaast heb je me ook veel kansen gegeven, variërend van het opzetten van nieuwe onderzoekslijnen tot het lesgeven, wat ik ook altijd met veel plezier heb gedaan. Desalniettemin had je altijd een scherpe visie en standvastigheid, wat het einddocument en mijn promotie ook zeker geholpen hebben.

Wannes, graag wil ik jou ook bedanken voor je bijdrage aan mijn promotie en proefschrift. Je was vanaf het begin al betrokken en belangrijk voor de richting van het project. Je positieve doch kritische blik heeft me erg geholpen en het manuscript beter gemaakt: je scherpe en correcte manier van formuleren heeft de accuraatheid ten goede gedaan. Daarnaast ben ik ook heel blij dat je me hebt geholpen met analyses, zoals die van de RNA-seq. Dat was zeker niet zo goed gegaan zonder jou.

Peter, ook jouw toevoegingen en feedback waren van onschatbare waarde voor het proefschrift. Naast dat je me van goede en scherpe feedback voorzag, was je ook altijd betrokken en geïnteresseerd in hoe het met me ging. In zo'n toch wel slopend proces, heb ik dat heel erg gewaardeerd.

Juan, you have been involved since the very beginning and honestly taught me most of my lab skills. Your ever-patient way of explaining made even very difficult assays easier. I think that internship that I started with under your supervision, was vital to my PhD and gave me the confidence to start. In addition to the lab skills you taught me, you also inspired me as a patient and kind teacher, which may be even more important than pipetting. It was always very nice to work with you.

Evelien, onze samenwerking begon tijdens COVID-19 en de BSc studenten supervisie, maar daarna ben je ook een hele grote rol gaan spelen bij de analyses van sommige experimenten. Je hebt me ontzettend veel geholpen in een hele moeilijke tijd – ik ben je daar heel erg dankbaar voor. Met name de gehele phosphoproteomics analyse zo laat in het stadium van mijn promotie onderzoek had ik waarschijnlijk niet zonder jou gekund. Daarnaast ben ik je heel dankbaar voor je geduld.



Ook de studenten die ik heb begeleid, wil ik heel graag bedanken. Sophie en Stijn, ik heb jullie begeleid voor jullie BSc stage en ondanks dat heftige COVID-19 jaar hebben jullie beiden zonder opgeven een ontzettend mooi project uitgevoerd waar ook echt hele leuke resultaten zijn uitgekomen. Ik wens jullie heel veel succes in jullie loopbaan. Dan alle MSc studenten! Suzanne, je was ontzettend leuk om mee te werken en ik ben blij dat je me hebt kunnen helpen. Daaf, je hebt goed werk gedaan en ik wens je veel succes. Charlotte, ik heb je ambitie en werklust altijd bewondert en we hebben ook echt hele gezellige tijden gehad in het lab. Christel, je creativiteit, onafhankelijkheid en goede werk heb ik altijd bewonderingswaardig gevonden. Myrthe, je werk was altijd super accuraat en netjes, wat ik altijd heel knap vond.

Saioa, I am happy to call you, in addition to a colleague, also a friend. Your positivity and support helped me so much throughout the years. It was very inspiring to see how much you care for research (and your little predators). When I tore the ligaments in my knee, you helped me so much - with groceries, with driving me to UvA and with many evenings of watching movies and eating roti. I am so lucky to have met you! Thank you for your contributions during my PhD.

Bart, de eerste keer dat we samenwerkten was in het begin van mijn BSc. Daarna tijdens mijn MSc stage, en tijdens mijn PhD. Ik heb je passie voor wetenschap en aanhoudendheid altijd heel inspirerend gevonden. Daarnaast heb ik ook heel erg veel van je geleerd, met name je precisie manier van te werk gaan en tijdens het schrijven van het review. Dank daarvoor! Het is een mooie publicatie geworden.

Also, a big thank you to all the colleagues of EPB, especially for the nice coffee breaks, lab outings and dinners, and for the nice little conversations in the hallways. Astrid, Hans, Martijn, Arne, Isabel, Emily, Karline, Patrick, Gerard, Paul, Juan, Michiel, Max, Giuditta, Dajo, Rachid, Elise, Naomi, Ernesto, Jessica, it was nice to have shared time with you. Old lab members, Alessandra, Bram, Alexandra, Nina, Livia, Cleide, Seyed, Tom, it was great to have spent some time with you.

In 2019, together with Diana, Kresimir and Martha, we organized the 2019 edition of the Plant – Insect Workshop in Amsterdam. Thank you for organizing this together – we made a wonderful event! It was nice to work with you and to get to know you better.

En dan mijn labmaatjes! Max en Rachid, ik ben heel blij dat we allemaal in het Kant lab terecht zijn gekomen zo rond dezelfde tijd. Altijd lachen met jullie, altijd leuke drankjes en avonden, feestjes en etentjes. Dat zijn toch wel de herinneringen waar ik het fijnste op terug kijk. Ook bedankt voor jullie (werk- en niet-werk-gerelateerde) adviezen, ik heb altijd heel veel steun van jullie gekregen. Hele leuke tijden hebben we gehad en hopelijk – ook al is ons leven nu een beetje anders – komen er nog heel veel leuke tijden aan. Ik wens jullie allebei heel veel geluk en ik hoop dat we nog heel lang vrienden blijven.

MSc UvA-maatje Tomas, ook jij hebt me ontzettend veel geholpen, dankje! De grappen die we hebben gemaakt zijn ware klassiekers, al vanaf dat we op het studenten-eiland zaten en we mijten aan het tellen waren. Ook alle burrito maaltjes, sportmiddagen, BBQs en wandelingen door de diverse Amsterdamse parken zijn hele fijne en leuke herinneringen. Heel erg bedankt voor je hulp tijdens m'n gescheurde kruisbanden thuis tijd – dat was echt wel een moeilijke tijd en je hebt me destijds heel erg geholpen.

Ook zonder mijn lieve vriendinnen was het echt niet hetzelfde geweest. Tessa, zowel binnen als buiten Amsterdam hebben we heel veel leuke dingen gedaan, mijn bezoek in Noorwegen was echt een van de meeste leuke reisjes tot nu toe. Daarnaast ben ik heel blij dat ik altijd mijn ei bij je kwijt kon. Nathalie, door de tijd heen zijn we steeds closer geworden en daar ben ik heel blij mee. Ik vind het heel fijn dat we zo goed over van alles en nog wat kunnen praten. Nienke, je bent eigenlijk al super lang een van mijn beste vriendinnen en dat zie ik nog heeeel lang zo doorgaan. Ik vind het heel fijn dat we elkaar zo hebben kunnen helpen de afgelopen jaren. Demi, door dik en dun ben je er voor me geweest – letterlijk altijd stond en sta je voor me klaar en daar ben ik zo blij mee! Ook wij hebben inmiddels zo veel avonturen meegemaakt – van foute series tot kakerlakken in Thailand. Mijn tijd in Amsterdam zou niet hetzelfde zijn geweest zonder jou.

Ik ben ook heel blij dat ik gedurende mijn gehele PhD-traject, mijn broers en zus zo dichtbij heb gehad. Lieve Ton, bedankt voor al je advies de afgelopen jaren en je inspiratie om een PhD te doen. Lieve Marco, bedankt voor al je lieve woorden, steun en peptalks. Lieve Jacqueline, bedankt voor je luisterend oor, adviezen en hulp met alles. Ik ben heel gelukkig met en trots op jullie als mijn broers en zus. Ook ben ik heel blij dat ik jullie prachtige gezinnetjes zie groeien. Bedankt Sach, Noerhan en Laylie, Aga, Paul, Lucas en Elisaatje.

Benjamin, mon cheri. I cannot express in words how happy I am with you. You supported me in so many ways – from data analysis in R to cheering me up whenever I needed it. Every day you give me some sunshine, and every day is better because of you. Thank you for your patience with me, thank you for being by my side. I am so happy and grateful to share my future with you. Big kiss.



Lieve papa en mama, ik kan niet in woorden uitdrukken hoe dankbaar ik ben voor jullie als ouders. Ik ben zo blij met wat jullie me hebben meegegeven. Ik ben zo blij met jullie onvoorwaardelijke steun en vertrouwen. Jullie betrokkenheid en steun op alle fronten heeft me altijd de zekerheid gegeven die ik nodig had. Heel erg bedankt.

ABOUT THE AUTHOR

Joséphine Blaazer was born in 1992 in Wormerveer, The Netherlands. She started her BSc study in the field of Biology at the University of Amsterdam in 2014, followed by a MSc study in Biological Sciences, with a focus on plants and molecular biology. Within the field of plant sciences, she liked biotic interactions of plants with microbes and herbivores the most, and pursued several internships within this field. During this time, she qualified for the Experimental Plant Science graduate program that allowed her to write together with dr. M.R. Kant a proposal for a PhD project. In November 2016, Joséphine started her PhD at the University of Amsterdam, in the group of Molecular and Chemical Ecology, at the Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics. She will defend her PhD on December 16th, 2021, at the Agnietenkapel in Amsterdam. During her PhD trajectory, Joséphine initiated and organized several scientific outreach events, including the events "Fantastic mites and how to control them". Her goal was to teach people of all ages and backgrounds on how sustainable agriculture is successful. Activities include National Science Weekend (2017 & 2018) and Girlsday (VHTO, 2018). In addition, she is co-director and board member of Aeolus Investments N.V., a data-driven investment company of the Blaazer family.