

Les plantes réagissent aux vibrations foliaires causées par la mastication des insectes herbivores

• [H. M. Appel](#) &

• [R. B. Cocroft](#)

[Oecologia](#) 175, p257–1266 (2014)

o a
Résumé l g

u e
La germination et la croissance des plantes peuvent être influencées par le son, mais la signification écologique de ces réponses n'est pas claire. Nous avons demandé si l'énergie acoustique générée par l'alimentation des insectes herbivores avait été détectée par les plantes. Nous rapportons que les vibrations causées par l'alimentation des insectes peuvent provoquer des défenses chimiques. Les rosettes d'*Arabidopsis thaliana* (L.) prétraitées avec les vibrations causées par l'alimentation des chenilles avaient des niveaux plus élevés de défenses en glucosinolates et anthocyanes lorsqu'elles étaient ensuite nourries par les chenilles de *Pieris rapae* (L.) que les plantes non traitées. Les plantes ont également fait la distinction entre les vibrations causées par la mastication et celles causées par le vent ou le chant des insectes. Les plantes réagissent ainsi aux vibrations générées par les herbivores de manière sélective et écologiquement significative. Une voie de signalisation vibratoire compléterait les voies de signalisation connues qui reposent sur des signaux volatils, électriques ou transmis par phloème. Nous suggérons que les vibrations peuvent représenter un nouveau mécanisme de signalisation à longue distance dans les interactions plantes-insectes qui contribue à l'induction systémique des défenses chimiques.

Introduction

Les effets du son sur la croissance des plantes et d'autres caractères sont reconnus depuis des décennies, mais l'importance écologique de ces réponses n'est pas claire. Bien que les réponses des plantes au vent et au toucher aient été examinées et aient une signification adaptative claire (Chehab et al. [2009](#)), les réponses des plantes à l'énergie acoustique ont été largement étudiées en l'absence d'un contexte écologique. Par exemple, il existe une longue tradition d'exposition des plantes au son musical (Klein et Edsall, [1965](#); Telewski, [2006](#); Jeong et coll., [2004](#)). Bien que la musique influence la croissance et la germination de certaines plantes, la musique contient une telle gamme de fréquences, d'amplitudes et de motifs temporels fins que son utilité en tant que stimulus expérimental est limitée. Des études plus systématiques ont montré que certaines fréquences ont une plus grande influence que d'autres (Telewski [2006](#)). Par exemple, les jeunes racines de maïs poussent vers la source de sons continus, transmis par des sons aériens ou hydriques, et réagissent de façon optimale à des fréquences de 200 à 300 Hz (Gagliano et al., [2012a](#)). Bien que ces études nous rapprochent de la possibilité de relier les réponses des plantes à l'énergie acoustique à des sources sonores écologiquement pertinentes, les

stimuli expérimentaux restent encore très éloignés de ceux produits par les sources naturelles d'énergie acoustique dans l'environnement de la plante.

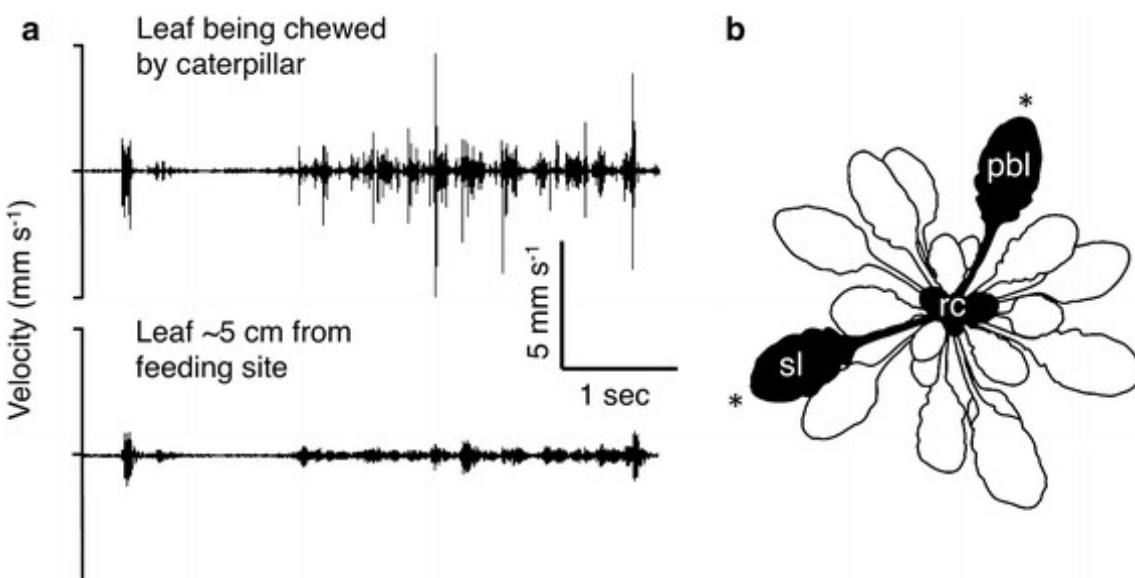
L'une des sources d'énergie acoustique les plus pertinentes dans l'environnement immédiat d'une plante est la riche communauté d'arthropodes associés aux plantes, y compris les herbivores, les prédateurs et les parasitoïdes (Cocroft et Rodriguez, [2005](#)). Les vibrations transmises par les plantes fournissent une mine d'informations sur les activités des insectes sur les plantes. Au sein de la communauté abondante d'arthropodes sur les plantes, de nombreuses interactions écologiques et sociales dépendent de la perception et de la production de vibrations transmises par les plantes (Hill, [2008](#)). Quelque 200 000 espèces d'insectes communiquent en utilisant les vibrations du substrat pour localiser les partenaires, attirer les mutualistes ou exploiter les ressources végétales (Cocroft et Rodriguez, [2005](#)). Beaucoup plus d'insectes et d'autres arthropodes utilisent de telles vibrations pour localiser leurs proies ou éviter les prédateurs (Barth, [1998](#); Castellanos et Barbosa, [2006](#); Casas et Magal, [2006](#); Virant-Doberlet et coll., [2011](#); Cocroft, [2011](#)). Les herbivores masticateurs, en particulier, produisent des vibrations caractéristiques de grande amplitude qui se déplacent rapidement vers d'autres parties de la plante. Les insectes prédateurs peuvent utiliser les vibrations masticatrices pour détecter leurs proies à une distance considérable : par exemple, sur le soja, les vibrations de mastication des vers verts du trèfle ont suscité la recherche de punaises prédatrices à 50 cm de distance (Pfannenstiel et al., [1995](#)).

Nous suggérons que les vibrations produites par la mastication des herbivores sont une source importante d'énergie acoustique pour les plantes. Si les plantes peuvent détecter et utiliser cette source d'information visible, fiable et transmise rapidement sur l'alimentation des herbivores, les tissus éloignés du site d'attaque pourraient utiliser les vibrations d'alimentation pour réagir rapidement à la menace de l'herbivorie. Une voie de signalisation vibratoire compléterait les voies de signalisation connues qui reposent sur des signaux transmis par phloème, des substances volatiles en suspension dans l'air ou des signaux électriques (Wu et Baldwin, [2009](#); Mousavi et coll., [2013](#)). Nous testons ici l'hypothèse selon laquelle les réponses des plantes à l'herbivorie, sous la forme de défenses chimiques induites, peuvent être provoquées par les vibrations mécaniques produites par la mastication des chenilles. Nous rapportons que les plantes *d'Arabidopsis thaliana* exposées à des vibrations de mastication ont produit de plus grandes quantités de défenses chimiques en réponse à l'herbivorie ultérieure, et que les plantes ont distingué les vibrations de mastication des autres vibrations environnementales.

Caractérisation des réponses des plantes à l'herbivorie : induction directe vs amorçage, réponses systémiques vs réponses locales

Les réponses de défense chimique peuvent résulter d'une induction directe, de sorte que les niveaux sont plus élevés après l'herbivorie initiale ou le signal de l'herbivorie; et/ou ils peuvent être amorcés, de sorte que les niveaux de défense sont plus élevés ou plus rapides après une attaque ultérieure d'herbivores (Frost et al. [2008](#)). Dans la première expérience ci-dessous, nous échantillons les feuilles seulement après l'herbivorie, ce qui nous permet de mesurer les défenses induites provoquées par les vibrations, mais pas de séparer les effets directs de l'amorçage. Dans la deuxième expérience, nous incluons un traitement sans herbivorie, ce qui nous permet de séparer l'amorçage des effets directs des vibrations de mastication sur les réponses des plantes. Les réponses induites peuvent également être locales, se produisant uniquement dans les tissus proches du site herbivore, ou systémiques, se produisant sur une plus grande échelle spatiale au sein de la plante (Kessler et Baldwin [2002](#)). Les vibrations de mastication se propagent rapidement à d'autres feuilles de la plante (Fig. [1a](#)) et ont donc le potentiel de déclencher une réponse systémique. Dans les expériences ci-dessous, nous examinons le potentiel d'effets locaux et systémiques en échantillonnant la feuille utilisée pour la lecture des vibrations de mastication, une feuille du même âge du côté opposé de la plante et les feuilles non étendues au centre de la rosette.

Fig. 1



a Vibrations produites par une chenille nourissante de *P. rapae* sur *A. thaliana*, enregistrées simultanément (à l'aide de deux vibromètres laser) sur la feuille nourrie et une deuxième feuille du côté opposé *de la plante*. Ces feuilles correspondent aux feuilles étiquetées 'pbl' et 'sl' dans la conception de lecture montrée dans le panneau suivant. **b** Plan d'échantillonnage pour les expériences. Une feuille plus ancienne a été sélectionnée pour les

enregistrements de chenilles et la lecture vibratoire (pbl), afin de permettre la fixation d'un actionneur avec un effet minimal sur le reste de la plante. Pour les plantes qui ont connu l'herbivorie (toutes les plantes de l'expérience 1 et la moitié des plantes de l'expérience 2), les chenilles ont été confinées dans des cages à pince placées sur la feuille de lecture et une feuille du même âge sur le côté opposé de la plante (sl). Les deux feuilles herbivores 24 ou 48 h après le traitement expérimental sont marquées d'un *astérisque*. Les jeunes feuilles non étendues du centre de rosette (rc) ont également été échantillonnées pour la chimie des feuilles, mais n'ont pas connu d'herbivorie

Image en taille réelle

Croissance des plantes

A. thaliana Les plantes Col-0 ont été cultivées dans des pots individuels #3 (55 × 57 mm) dans du terreau (Pro-Mix; Premier Horticulture Inc., Quakertown, PA, États-Unis) additionné de 1,8 kg d'engrais Osmocote™ à libération lente (The Scotts Company, Marysville, OH) par mètre cube de sol. Les plantes ont été cultivées sous des lampes aux halogénures métalliques à 24 °C et 62 % d'humidité relative avec une température de 8:16 h (L:D) 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photopériode. Les plantes végétatives (rosette seulement) utilisées dans les expériences étaient 4 semaines après la germination. Deux jours avant les expériences, les plantes ont été transplantées dans des tubes centrifugeuses coniques en plastique de 50 ml afin de maximiser la quantité de surface foliaire surplombant le récipient à utiliser pour le traitement par vibrations.

Enregistrements de vibrations

Pour enregistrer les vibrations alimentaires des chenilles, nous avons permis aux chenilles de *P. rapae* du quatrième stade de se nourrir d'une feuille d'une plante en pot ($N = 22$ chenilles et plantes) et enregistré les vibrations ressenties par la feuille nourrie et une feuille du côté opposé de la plante (Fig. 1a, b). Les vibrations de mastication ont été enregistrées à $24,5 \pm 1$ °C avec la vibrométrie Doppler laser (module décodeur Polytec CLV 1000 et CLV M030). Pour reproduire expérimentalement les vibrations d'alimentation de la chenille, nous avons utilisé des actionneurs piézoélectriques soutenus sous une feuille (Electronic Supplementary Material Fig. 1A) et fixés à la feuille à l'aide de cire de montage d'accéléromètre. Avant la lecture des vibrations enregistrées sur la feuille nourrie, nous avons caractérisé la réponse en fréquence de chaque actionneur, puis conçu un filtre numérique qui compense cette réponse (Cocroft [2010](#)). Les stimuli de lecture ont ensuite été filtrés pour produire des lectures qui correspondaient étroitement aux propriétés temporelles et spectrales des enregistrements originaux (Electronic Supplementary Material Fig. 2). Nous avons calibré l'amplitude de chaque lecture pour qu'elle corresponde à celle de l'enregistrement original.

Nous avons basé notre conception de lecture sur le comportement alimentaire des chenilles de *P. rapae*, qui passent en moyenne 100 ± 223 minutes sur une feuille, alternativement se nourrir et se reposer (Coffman, comm. pers.). Nos stimuli de lecture consistaient en 10 s de mastication suivies d'une pause de 10 secondes, répétée pendant 5 minutes; Il y a ensuite eu une pause de 5 minutes. Ce schéma de base de 10 minutes a été répété pendant 120 minutes pour refléter le moment naturel de l'activité alimentaire de *P. rapae*.

Croissance des insectes et traitements des herbivores

P. rapae (L.) ont été élevés à 24 °C sur des plantes d'*A. thaliana* cultivées en pots comme décrit ci-dessus, et sont la descendance de souches biologiques obtenues à l'origine de Carolina Biological et du laboratoire Jander (Cornell University, Ithaca, NY). Des chenilles post-ecdysales du quatrième stade ont été utilisées pour toutes les expériences. Les insectes ont été retirés de ces plantes pendant un maximum de 3 h avant utilisation. Les chenilles ont été placées sur une feuille de rosette externe plus ancienne comme celles utilisées pour la lecture vibratoire, après quoi la plupart des individus ont commencé à se nourrir de la feuille. Des enregistrements de vibrométrie laser des vibrations d'alimentation des chenilles ont été réalisés à partir de la feuille nourrie près de la base du limbe de la feuille. Les traitements d'herbivorie ont commencé 30 minutes après la lecture des vibrations d'alimentation. Les larves individuelles ont été confinées à l'aide d'une cage à pince (Electronic Supplementary Material Fig. 1B) dans une feuille complètement élargie dans la rosette, et ont été laissées se nourrir jusqu'à ce qu'environ 30 % de la feuille ait été enlevée. Les feuilles herbivores comprenaient la feuille de lecture et une feuille du même âge du côté opposé de la plante (Fig. 1b). Le traitement sans herbivore (Expérience #2, ci-dessous) consistait en des cages à pince vides sur les feuilles correspondantes. Les feuilles ont été récoltées en azote liquide 24 et/ou 48 h après l'alimentation des chenilles, selon l'expérience.

Chimie de défense

A. thaliana produit trois grandes classes de défenses chimiques en plus grande quantité après les dommages causés par les insectes : les glucosinolates (GS : Mewis et al. 2005), les anthocyanes polyphénoliques (ACs : Ferrieri et al. 2013) et une série de composés volatils (Snoeren et al. 2010). Les procédures de quantification des glucosinolates ont été adaptées à partir de protocoles décrits précédemment (Mewis et al. 2005). Les feuilles ont été lyophilisées (2–4 mg DW) avant d'être broyées en une poudre fine dans un homogénéisateur Talboys à haut débit (Troemer, NJ, USA) pour l'extraction. Les glucosinolates ont été extraits trois fois dans du méthanol à 70 % / DI H₂O à 80 °C pendant 5 min. Les surnageants ont été mis en commun et placés dans une centrifuge jusqu'à ce qu'ils soient secs. Les pastilles ont été remises en suspension dans 40 µL d'acétate de baryum 0,4 M et 370 µL d'eau désionisée pour précipiter les protéines, et désulfatées pendant la nuit sur DEAE Sephadex A-25 dans des plaques filtrantes à 96 puits. Les plaques ont été préparées par filtration sous vide avec deux lavages de 200 µL de formiate d'imidazole 6 M suivis de trois lavages supplémentaires de DI H₂O. Des

extraits bruts de glucosinolate ont été ajoutés à des puits individuels et lavés deux fois avec une solution tampon d'acétate de sodium (pH 4,0). Une solution de sulfatase (30 µL) a été ajoutée à chaque échantillon pour une désulfuration nocturne à 4 °C. Les glucosinolates désulfatés ont été élués deux fois dans 150 µL d'eau distillée à l'aide d'un collecteur à vide. La détection et la quantification d'indolyles désulfatés individuels et de glucosinolates aliphatiques ont été réalisées à l'aide d'une CLHP Waters Alliance 2695 en tandem avec un spectromètre de masse détecteur TQ Waters Acquity, sur une colonne RP C18 à l'aide d'un gradient linéaire eau/acétonitrile. Les glucosinolates ont été surveillés par un détecteur UV à 229 nm et quantifiés à l'aide d'un étalon interne (sinalbin) ajouté avant l'extraction. Nos analyses HPLC nous ont permis de quantifier les concentrations molaires de dix composés glucosinolates individuels, dont sept glucosinolates aliphatiques [3-méthylsulfinylpropyl (3 MSOP), 4-méthylsulfinylbutyl (4MSOB), 5-méthylsulfinylpentyl (5MSOP), 6-méthylsulfinylhexyle (6MSOH), 7-méthylsulfinylheptyl (7MSOH), 4-méthylthiobutyle (4MTB) et 8-méthylsulfinyloctyl (8MSOO)] et 3-indolyl glucosinolates [3-indoyl-méthyl-(I3 M), 4-méthoxy-3-indolylméthyl-(4MOI3 M) et 1-méthoxy-3-indolylméthyl-(1MOI3 M)].

Les polyphénols, y compris les anthocyanes, ont été extraits et quantifiés comme décrit précédemment (Ferrieri et al. [2013](#)). Les feuilles individuelles ont été lyophilisées (4–6 mg par jour), broyées comme décrit ci-dessus, extraites et quantifiées. Les composés phénoliques ont été extraits pendant une nuit dans 200 µl de HCl à 1 % (v/v) dans du méthanol à 4 °C. Une extraction supplémentaire avec 250 µl d'eau distillée et 500 µl de chloroforme a été utilisée pour éliminer la chlorophylle. Les échantillons ont été vortex et centrifugés pendant 3 minutes à 3 000×g. Les niveaux relatifs d'anthocyanes dans la phase aqueuse ont été déterminés spectrophotométriquement en mesurant l'absorbance à 530 nm. Les composés flavonoïdes totaux ont également été estimés dans les mêmes extraits à une absorbance de 320 nm (Fukumoto et Mazza, [2000](#); Shao et coll., [2008](#)). La concentration de composés phénoliques totaux réactifs à l'oxydoréduction présents dans les extraits de feuilles a été déterminée à l'aide du test Folin-Denis, avec des courbes standard élaborées à l'aide d'acides chlorogénique et gallique et des étalons purifiés de chaque groupe de traitement (Appel et coll., [2001](#)).

Expérience #1

Dans la première expérience, nous avons rejoué les vibrations des chenilles aux plantes naïves d'*A. thaliana*, en utilisant des actionneurs piézoélectriques (actionneurs AE0505D18F et contrôleurs MDT693B et MDR694B, Thorlabs, Inc., Newton, New Jersey, États-Unis). Dans chaque répétition ($N = 22$), nous avons utilisé un exemple de mastication différent des enregistrements réalisés ci-dessus. Une seule réplique comprenait quatre plantes: deux plantes ont reçu la lecture de mastication, tandis que deux ont reçu un contrôle fictif (actionneur silencieux fixé à la feuille). Les vibrations d'alimentation des chenilles ont été transmises aux plantes pendant 2 heures, comme décrit ci-dessus. Immédiatement après la lecture, nous avons laissé les chenilles *P. rapae* du

quatrième stade se nourrir dans des cages individuelles (Electronic Supplementary Material Fig. 1B) sur la feuille vibrée et une feuille non vibrée appariée selon l'âge (Fig. 1b) sur toutes les plantes jusqu'à ce qu'environ 30 % de la surface foliaire soit consommée. 24 et 48 heures plus tard, les feuilles cibles et non ciblées ainsi que le groupe central des feuilles non expansées ont été enlevés, surgelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C . Les feuilles ont été lyophilisées avant l'analyse des GS. Nous avons évalué l'influence du traitement par vibrations (vibration de mastication vs contrôle sans vibration), des tissus (feuille de lecture, feuille systémique du même âge, feuilles non expansées au centre de la rosette) et de l'intervalle d'échantillonnage (24 vs 48 h) sur la concentration de glucosinolates aliphatiques et indolyliques à l'aide d'un modèle mixte linéaire général dans SAS v. 9.3 (à l'aide de PROC GLIMMIX; Code SAS fourni dans Electronic Supplementary Material, Tableau 1) avec une distribution gamma (Bolker et al. 2009). Notez que bien que nous ayons échantillonné les feuilles de rosette centrale sur les plantes nourries pour évaluer tout changement dans les niveaux de GS, ces feuilles n'ont pas été elles-mêmes nourries (il n'est pas possible d'attacher des cages à pince à ces feuilles non élargies), et tout changement observé dans le centre de la rosette serait une réponse à l'herbivorie sur d'autres feuilles. Les quatre usines ayant reçu le traitement par vibration en même temps ont été traitées comme un bloc, et le bloc a été inclus dans le modèle comme un effet aléatoire. Comme nous avons testé deux variables de réponse (glucosinolates aliphatiques totaux et glucosinolates indolyliques totaux), les valeurs *p* résultantes ont été ajustées pour des comparaisons multiples à l'aide de la procédure du taux de fausse découverte (Benjamini et Hochberg, 1995; Garcia, 2004).

Expérience #2

La conception de cette expérience était similaire à l'expérience précédente, mais avec trois différences qui nous ont permis de répondre à des questions supplémentaires. Tout d'abord, nous avons demandé si les vibrations provoquaient la production de phénoliques, la deuxième grande classe de défenses chez *A. thaliana*, plutôt que de glucosinolates. Deuxièmement, nous avons évalué les rôles de l'induction directe (défenses accrues en l'absence d'herbivorie) par rapport à l'amorçage (défenses accrues en réponse à l'herbivorie), en ajoutant un traitement « sans herbivorie » composé de plantes qui ont reçu les lectures de vibrations et les cages à pince mais pas d'alimentation de chenilles. Troisièmement, nous avons demandé si la réponse aux vibrations était spécifique aux vibrations de mastication, par opposition à être induite par n'importe quelle vibration, une possibilité non exclue par la première expérience. Pour répondre à cette question, nous avons inclus deux contrôles de vibrations supplémentaires: les vibrations induites par le vent, une source courante de bruit vibratoire sur le terrain; et le chant d'accouplement vibratoire d'une cicadelle, choisi parce qu'il a un spectre de fréquence similaire à celui de la mastication, mais un motif temporel contrasté. Les vibrations induites par le vent ont été obtenues en dirigeant un petit ventilateur sur des plantes *A. thaliana* de la même taille que les

plantes expérimentales et en enregistrant le mouvement des feuilles à l'aide de la vibrométrie laser. Les enregistrements Leafhopper ont été tirés d'une bibliothèque de signaux précédemment enregistrés par Cocroft. Comme ci-dessus, l'amplitude de chaque lecture de mastication a été adaptée à celle de l'enregistrement original. Les amplitudes de déplacement des exemplaires de vent et de cicadelle dans chaque réplique ont été comparées à celles de l'exemplaire de mastication correspondant. Les vibrations de mastication et de cicadelle ont été lues à l'aide d'actionneurs piézoélectriques, mais les enregistrements de vent contenaient principalement des fréquences très basses qui étaient mieux reproduites avec un aimant et une bobine extraits de haut-parleurs audio (voir Cocroft [2010](#) pour une discussion sur les méthodes de lecture). Pour obtenir un contact uniforme entre tous les actionneurs et la feuille de lecture, de courtes longueurs de cheville de balsa ont été fixées à chaque transducteur (Electronic Supplementary Material Fig. 1A), le contact entre la cheville et la feuille étant sécurisé à l'aide de cire de montage d'accéléromètre. Nous avons effectué 18 répliques des lectures, chacune contenant huit plantes, avec deux plantes par traitement par vibration. Les traitements par vibration comprenaient la mastication des chenilles, les vibrations induites par le vent, le chant d'accouplement des cicadelles et un simulacre sans vibration, comme décrit ci-dessus. Chaque répétition utilisait différents enregistrements exemplaires (c.-à-d. qu'aucun enregistrement n'a été utilisé dans plus d'une répétition), et la répétition a été traitée comme un bloc pour l'analyse statistique. L'utilisation de deux plantes pour chaque traitement dans un bloc nous a permis de tester à la fois l'induction directe et l'amorçage, en exposant la moitié des plantes dans chaque traitement vibratoire à l'alimentation des chenilles et l'autre moitié à des cages vides. Pour tester un effet direct, nous avons mesuré la chimie de défense 48 h après l'herbivorie en lecture et les feuilles systémiques du même âge des plantes qui ont subi les traitements vibratoires mais pas d'herbivorie. Pour isoler les effets d'amorçage des effets directs, nous avons pris le rapport des réponses des plantes dans la même réplique qui a connu et n'a pas connu l'herbivorie. Étant donné que les plantes appariées ont reçu les mêmes exemples de vibrations, tous les effets directs apparaîtront à la fois dans le numérateur et le dénominateur du rapport, annulant et ne laissant que l'effet d'amorçage. Notez que, comme dans l'expérience #1, les feuilles de rosette centrale non élargies n'ont pas connu d'herbivorie.

Nous avons analysé les données à l'aide d'un modèle mixte linéaire général avec une distribution gamma, comme ci-dessus, pour examiner l'influence du traitement par vibration (mastication, vent, chant des insectes, pas de contrôle des vibrations) et des tissus (feuille vibrée, feuille non vibrée du même âge, feuilles non expansées au centre de la rosette) sur les réponses phénoliques. La réplification (l'ensemble des huit plantes testées en même temps) a été incluse en tant qu'effet de bloc aléatoire. Parce que nous avons mesuré trois variables de réponse (anthocyanes, flavonoïdes et activité phénolique redox mesurée par le test de Folin-Denis),

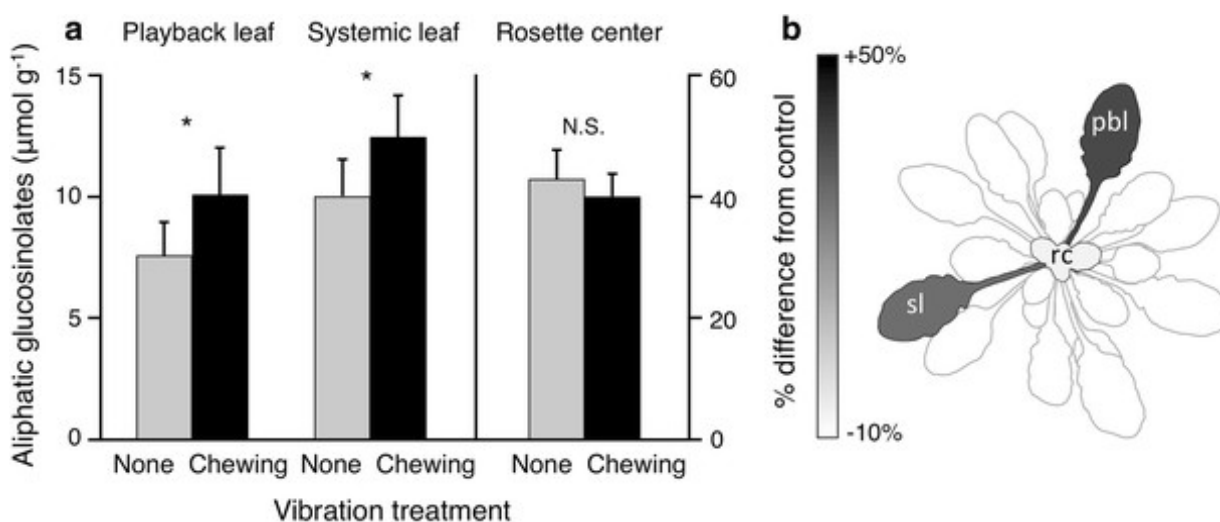
nous avons utilisé la procédure du taux de fausse découverte décrite ci-dessus pour ajuster le taux d'erreur de type I à l'échelle de l'expérience.

Note: the data from this study are provided in the Electronic Supplementary Material 2.

Results

Aliphatic GSs were higher in plants that had previously experienced chewing vibrations, than in plants that had experienced no vibrations ($p < 0.05$; Fig. 2a; Electronic Supplementary Material Table 1; note that all p values reported in the Results section have been adjusted for multiple comparisons using the False Discovery Rate procedure) and leaf type ($p < 0.001$). The levels of aliphatic GSs varied with leaf type, with glucosinolate levels higher in the unexpanded central rosette leaves than in the more mature leaves ($p < 0.001$; Fig. 2). Because there was a trend for the interaction of vibration treatment and leaf type ($p < 0.07$), we examined the response of the three leaf types from the same plant (the leaf receiving the playback; another leaf of the same age; and the unexpanded leaves in the center of the rosette). The response was both local and systemic, with similar changes in the vibrated leaf and a second leaf of the same developmental stage (Fig. 2a, both $p < 0.05$ based on post hoc comparisons). Aliphatic glucosinolates increased by 32 % in the playback leaf and 24 % in the same-age systemic leaf (Fig. 2b). There was no response in the unexpanded central rosette leaves ($p = 0.59$), which were not fed upon by the herbivore. There was no change in response to vibration treatment in indolyl glucosinolates (vibration treatment $p = 0.71$), although there was a nonsignificant trend for an interaction of leaf type and vibration treatment (Electronic Supplementary Material Table 2), and the changes in some individual indolyl compounds mirrored those for aliphatic compounds (Electronic Supplementary Material Fig. 3).

Fig. 2

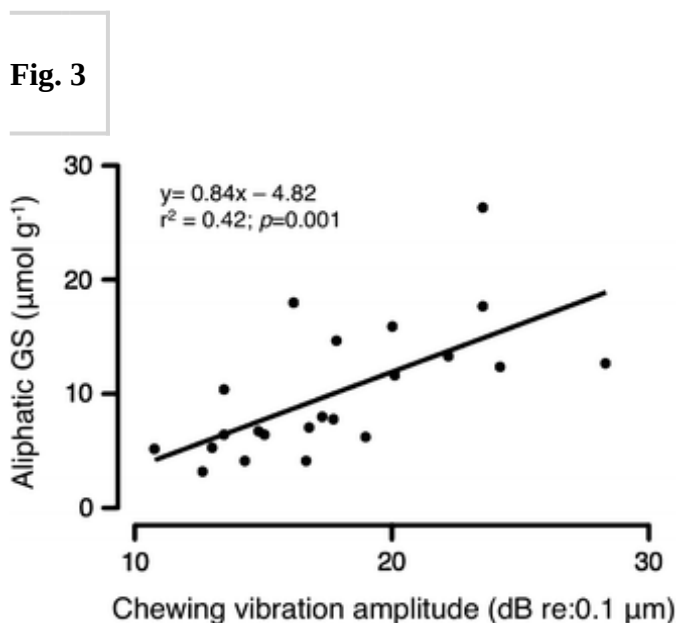


a Playback of caterpillar feeding vibrations increased the induced response of *A. thaliana* to herbivore damage, compared to no-vibration controls ($*p < 0.05$, error bars 95 % confidence intervals; there was no difference between the 24 and 48 h samples, so they were pooled here). $N = 44$ per bar (43 for rosette center). **b** Grayscale

map showing the increase in aliphatic glucosinolates in the playback and same-age systemic leaves, expressed as the percent change from the levels in controls

[Full size image](#)

Variation in amplitude among the 22 chewing exemplars influenced the glucosinolate response. In the recordings used for playback, the maximum displacement of the leaf surface caused by caterpillar chewing varied over nearly an order of magnitude (0.35–3.1 μm). Larger displacements caused the induction of more aliphatic GSs (averaging the 24 and 48 h samples for each exemplar) in the leaf receiving the playback (Fig. 3). The relationship was stronger when the displacement was expressed on a decibel scale than when expressed on a linear scale ($r^2 = 0.42$ vs. 0.23).



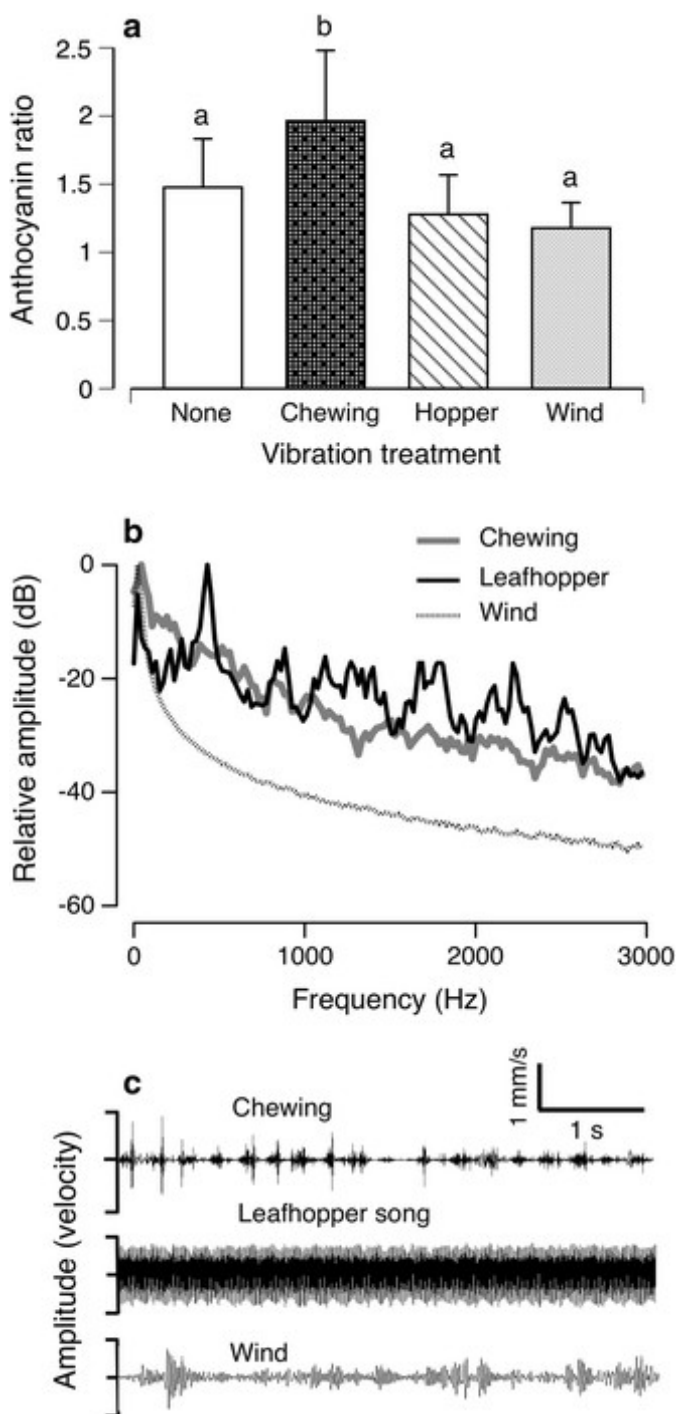
Relationship between the amplitude of the chewing vibration exemplars used in playbacks and the level of induced aliphatic GS. Linear regression, $N = 22$

[Full size image](#)

In the second experiment, there was no direct induction caused by the vibration treatments—i.e., no increase in defenses in the absence of herbivory—for any of the polyphenol chemical defenses measured (anthocyanins, flavonoids or phenolic redox activity as measured by the Folin-Denis assay; all $p > 0.37$, Electronic Supplementary Material Fig. 4, Tables 3–5). However, there was a significant priming effect of the vibration treatment on the levels of anthocyanins after herbivory (vibration treatment, $p < 0.05$, Fig. 4; Electronic Supplementary Material Table 6). A planned contrast revealed that anthocyanin levels were significantly higher in plants that were pre-treated with chewing vibrations, than in the control treatments (vibrations from wind or leafhopper, no vibrations; Fig. 4a). There was an effect of leaf type ($p < 0.05$), with baseline levels of anthocyanins higher in the mature leaves than in the unexpanded central rosette leaves, but there was no

interaction between leaf type and vibration treatment ($p > 0.25$). Flavonoids and phenolic redox activity were not primed by the vibration treatment ($p > 0.7$; Electronic Supplementary Material Fig. 5, Tables 7, 8).

Fig. 4



a Chewing vibrations increased the anthocyanin response to herbivory by *A. thaliana* (the ratio of response in fed-upon plant vs. non-fed-upon plant, when both had same treatment exemplar). Error bars 95 % CI. Letters above bars indicate that the response to the chewing treatment was significantly different ($p < 0.001$) from responses to the three controls. **b** Averaged amplitude spectra of the stimuli used in the experiment ($N = 18$ for each stimulus type) suggest that chewing can be distinguished from wind, but not from leafhopper song, based on the frequency content. **c** Vibration waveforms of a chewing *P. rapae* caterpillar on *A. thaliana*; wind on *A.*

thaliana; and a leafhopper, recorded on another host plant. Chewing and leafhopper song have similar amplitude spectra but different temporal features

[Full size image](#)

Vibrations caused by caterpillar chewing were distinct from those caused by wind and leafhopper song (Fig. 4b, c). *P. rapae* caterpillars typically begin feeding on the leaf edge, producing a semicircular hole that enlarges as the caterpillar removes thin strips along the edge of the cut (to watch this behavior and listen to the vibrations produced, see Electronic Supplementary Material Fig. 6 for QR code and link to video). A strip of leaf tissue is removed as the caterpillar extends its head and gradually draws it closer to the body, closing its mandibles 3–5 times per second ($x = 4.1 \pm 0.56/s$, $N = 22$ caterpillars). Each mandible closure produces a short pulse of vibrations (Figs. 1, 4c, Electronic Supplementary Material Fig. 2A) with a broad frequency range (Fig. 4b, Electronic Supplementary Material Fig. 2B). The vibration waveform thus consists of series of broadband pulses, with short pauses while the caterpillar extends its head to remove the next strip of tissue. The vibrations generated by low-velocity wind lack the high frequencies produced by chewing (Fig. 4b, c). Leafhoppers produced vibrational signals with a frequency spectrum similar to that produced by caterpillar chewing, but with a different temporal pattern (Fig. 4b, c).

Discussion

Insects are among the most important consumers of plants in terrestrial ecosystems, and plants have evolved an array of traits that allow them to detect and respond to damage from feeding insects (Karban and Baldwin 1997). Changes in plants that increase resistance to subsequent herbivory can occur locally at the site of damage, or systemically at sites distant from the attack (Karban and Myers 1989). Localized feeding causes induction of chemical defenses in undamaged tissues by several proposed mechanisms, including signaling molecules that move within the plant (Pearce et al. 2008), airborne transport of leaf volatiles (Frost et al. 2007, 2008; Heil and Silva Bueno 2007a), and electrical signals (Mousavi et al. 2013; Fromm and Lautner 2007; Van Bel et al. 2011). Vibrational signals are likely to complement other signals that plants receive from herbivory; however, none of these mechanisms has been shown to transmit signals to all plant parts as rapidly as mechanical vibrations (10–100 m/s; Coccoft and Rodriguez 2005). We have found that plants can take advantage of this rapid and overlooked source of information about herbivory to produce a systemic response, via perception of the mechanical vibrations produced by feeding.

Les réponses aux glucosinolates et aux anthocyanes ont toutes deux été provoquées par l'exposition aux vibrations de mastication, mais au moins dans les anthocyanes, il n'y avait pas d'effet direct; Au lieu de cela, les anthocyanes ont été amorcés, l'augmentation des défenses n'étant révélée qu'en réponse à l'herbivorie.

L'induction de défenses était-elle assez importante pour avoir un effet écologique ? Pour la chenille noctuée *Spodoptera exigua* qui se nourrit d'*A. thaliana*, il existe une forte corrélation négative ($r = -0,719$) entre les glucosinolates induits et le taux de croissance des chenilles (Mewis et al. [2005](#), Fig. 8F). Nous estimons à partir de cette relation que l'augmentation de l'induction totale de GS causée par l'exposition aux vibrations de mastication diminuerait le taux de croissance de *S. exigua* d'environ 15 à 20 % (estimé à partir des niveaux de GS aliphatique + indolyl dans les feuilles de lecture et de même âge, comparés entre les traitements témoins et de mastication). Nous manquons d'informations similaires sur la relation entre les anthocyanes et la croissance de *S. exigua*, nous ne pouvons donc pas estimer l'impact de l'augmentation des anthocyanes sur les herbivores. Les anthocyanes et autres polyphénols ont une activité biologique chez de nombreux insectes, mais l'effet varie, comme avec toutes les défenses chimiques putatives, avec la combinaison spécifique de la plante et de l'herbivore (voir Appel [1993](#) et Lattanzio et al. [2006](#) pour les examens). Pour les deux types de chimie, des estimations plus précises de leur impact sur la valeur adaptative nécessiteront de mesurer les effets des vibrations sur les défenses induites et la croissance des insectes, et d'examiner d'autres traits influençant la valeur adaptative des plantes, tels que le choix de ponte.

L'amorçage consiste à « se préparer à une autre bataille » (Frost et al. [2008](#)), une forme de défense qui prépare une plante à réagir plus rapidement ou plus fortement à l'herbivorie future. Dans quelles circonstances les vibrations de mastication pourraient-elles prédire une future attaque d'herbivores ? Le rôle le plus important des vibrations herbivores est probablement à l'intérieur des plantes individuelles, avec des vibrations se propageant à partir de la feuille nourrie, complétant d'autres voies de signal pour provoquer une réponse systémique. Cependant, l'écoute entre les plantes peut être possible, comme dans le cas des substances volatiles des feuilles vertes qui fonctionnent dans la signalisation à l'intérieur de la plante, mais qui peuvent être perçues par les plantes voisines (Karban et al., [2006](#); Heil et Silva Bueno, [2007a, b](#)). Les vibrations peuvent se propager d'une plante à l'autre par l'intermédiaire des racines ou des tiges qui se connectent (Cokl et Virant-Doberlet, 2003), et même dans l'air entre les feuilles situées à quelques centimètres près (Eriksson et al., [2011](#)). Dans ces conditions, les vibrations générées par une chenille à mâcher pourraient alerter les plantes voisines de la présence d'un herbivore. La relation observée entre l'amplitude des vibrations et les glucosinolates induits suggère que l'effet des vibrations des herbivores sera le plus important près de la source. Cependant, bien que l'amplitude des vibrations transmises par les plantes diminue avec la distance, la diminution n'est pas monotone (Cokl et Virant-Doberlet [2003](#)), et le même niveau d'énergie vibratoire entraînera plus de mouvement dans les structures de plus petit diamètre. En conséquence, pour comprendre la propagation intra-usine et entre les plantes des défenses induites par les vibrations, il faudra cartographier plus précisément la transmission de l'énergie vibratoire et évaluer l'efficacité des vibrations de mastication pour déclencher une défense lorsque

leur amplitude et d'autres caractéristiques ont été modifiées avec la distance. De plus, bien que *A. thaliana* ait réagi différemment aux vibrations de mastication, au chant des cicadelles et au vent lorsque chacun était présenté seul, nous ne savons pas encore comment la présence de multiples sources de vibrations influence la détection du signal. Par exemple, le vent interfère-t-il avec la perception des vibrations des herbivores par les plantes, de sorte que la détection des herbivores basée sur les vibrations fonctionne mieux lorsque la vitesse du vent est faible? De toute évidence, des recherches sur l'écologie sensorielle des plantes dans un environnement vibratoire naturel sont nécessaires pour révéler le rôle des vibrations dans la défense des plantes sur le terrain. Pour qu'un système de détection d'herbivores basé sur les vibrations fonctionne dans la nature, les plantes doivent distinguer les vibrations qui signalent l'alimentation des herbivores des nombreuses vibrations environnementales qui ne le font pas. L'amorçage des défenses chez les plantes d'*A. thaliana* est en effet sélectif : les anthocyanes ont été amorcés par les vibrations de mastication des chenilles, mais pas par les vibrations du vent ou le chant des cicadelles. La façon dont une telle sélectivité est obtenue est une question ouverte dans la détection des plantes. Les animaux de signalisation acoustique, comme les grenouilles et les insectes, distinguent les signaux sur une base multivariée plutôt que sur une base univariée (Gerhardt et Huber, [2002](#)). Les réponses sélectives des plantes d'*A. thaliana* dans cette étude peuvent également avoir dépendu d'une combinaison de caractéristiques de signal. Par exemple, la mastication et les vibrations induites par le vent diffèrent grandement dans leur contenu fréquentiel : les vibrations de mastication contiennent à la fois des basses et des hautes fréquences, tandis que les vibrations du vent sont dominées par les basses fréquences (Fig. [4b](#); Cocroft et Rodriguez, [2005](#)). Les racelles des semis de *Z. mays* poussent plus fortement vers des tonalités aqueuses dans une gamme de fréquences particulière (Gagliano et al., [2012a](#)). De même, il serait possible pour les feuilles d'*A. thaliana* d'amorcer sélectivement leurs défenses à la mastication en ne répondant qu'aux vibrations contenant des fréquences plus élevées. Cependant, bien que la gamme de fréquences puisse être suffisante pour permettre à *A. thaliana* de distinguer la mastication des vibrations induites par le vent, il est peu probable qu'un mécanisme basé sur la fréquence explique l'absence de réponse des plantes au chant des cicadelles, dont le spectre d'amplitude chevauche largement celui de la mastication (Fig. [4b](#)). Les vibrations de mastication et le chant des cicadelles diffèrent cependant de façon frappante par leur schéma temporel : les vibrations de mastication consistent en de courtes rafales d'énergie répétées, tandis que le chant de la cicadelle était relativement constant en amplitude (Fig. [4a](#)). La sélectivité de *A. thaliana* peut donc reposer à la fois sur le contenu fréquentiel et sur les caractéristiques grossières-temporelles. Le recours à de multiples composants de signal augmenterait probablement la fiabilité de la détection des herbivores basée sur les vibrations, car les signaux vibratoires sont soumis à un filtrage de fréquence et à une dégradation des

caractéristiques temporelles lorsqu'ils se propagent le long des tiges des plantes (Fig. 1; Virant-Doberlet et Cokl, 2004).

Les mécanismes utilisés par les plantes pour détecter les vibrations mécaniques et y réagir ont récemment fait l'objet d'une attention expérimentale (Chehab et al., 2009; Monshausen et Gilroy, 2009; Niklas 2009; Coutand, 2010; Li et Gong, 2011; Gagliano et coll., 2012a, b; Veley et Haswell, 2012; Haswell et Monshausen, 2013; Gagliano et Renton, 2013). On pense que la mécanoréception commence par le déclenchement de mécanocapteurs dans la paroi cellulaire et/ou la membrane plasmique, semblables à ceux connus des bactéries, mais non confirmés chez les plantes (Haswell et Monshausen 2013). Les mécanocapteurs provoquent des flux de Ca^{2+} , ROS et H^{-} , qui déclenchent des réactions en aval qui font intervenir de nombreuses hormones végétales et l'expression rapide de gènes qui réagissent tôt à de nombreux stress des plantes (Lee et al., 2005; Walley et coll., 2007; Kagaya et Hattori, 2009). Plusieurs de ces hormones, en particulier les jasmonates et l'éthylène et leurs voies de biosynthèse respectives, jouent un rôle important dans la réponse des plantes aux herbivores (Moreno et al. 2009; Leon-Reyes et coll., 2010). En conséquence, les voies de signalisation du jasmonate et de l'éthylène sont un mécanisme probablement immédiat par lequel les vibrations mécaniques transmises par les plantes qui imitent l'alimentation des insectes influencent les premières réponses de défense des plantes. Des informations supplémentaires sur les indices vibratoires spécifiques utilisés par *A. thaliana* peuvent également éclairer la recherche de mécanismes; par exemple, la relation entre l'amplitude vibratoire et la réponse glucosinolate était plus forte lorsque l'amplitude était exprimée sur une échelle de décibels, suggérant un parallèle entre la perception des plantes et la perception animale (Varshney et Sun 2013) des stimuli mécaniques.

La capacité des plantes à augmenter leurs défenses en réponse à des vibrations à l'échelle micrométrique appuie les hypothèses récentes selon lesquelles les plantes peuvent détecter et réagir aux vibrations de faible amplitude produites par les plantes voisines (Gagliano et al. 2012a, b, Gagliano et Renton 2013). Les réponses des plantes aux signaux acoustiques ont été suggérées par des études montrant que la germination des plantules (Gagliano et al., 2012a) et leur croissance (Gagliano et al., 2012b) sont influencées par la présence de plantes voisines, même lorsque les indices visuels et chimiques ont été exclus (Gagliano et Renton, 2013). Les parties aériennes et souterraines des plantes connaîtront des environnements vibratoires contrastés, le sol amortissant une grande partie de l'énergie vibratoire provenant des feuilles et des tiges (Hill, 2008). Cependant, l'herbivorie souterraine peut être étendue (van Dam 2009), et les vibrations générées par les herbivores racinaires sont également un ensemble potentiel de signaux pour les défenses inductibles dans les racines.

Les vibrations produites par les herbivores mâcheurs interagissent probablement avec d'autres indices pour provoquer des défenses systémiques. La présente étude suggère deux hypothèses, qui ne s'excluent pas

mutuellement, pour expliquer pourquoi la lecture des vibrations de mastication a provoqué un amorçage systémique des glucosinolates et des anthocyanines. Premièrement, parce que les vibrations se propagent dans toute la plante, les vibrations transmises pourraient avoir provoqué un amorçage dans les feuilles systémiques, comme elles l'ont fait dans la feuille de lecture. Alternativement, les vibrations dans la feuille de lecture auraient pu déclencher une signalisation systémique de cette feuille sous la forme de substances volatiles en suspension dans l'air, de signaux transmis par phloème ou de signaux électriques. Si les vibrations de mastication provoquent la libération de substances volatiles en suspension dans l'air, il est possible que la signalisation vibratoire et volatile puisse avoir un effet synergique comme c'est le cas chez les insectes sociaux (Hölldobler, [1999](#)), où les deux fonctions de communication d'alarme au sein d'une colonie et où chacun peut moduler le seuil de réponse à l'autre. Les recherches futures seront conçues pour comprendre comment les vibrations mécaniques interagissent avec d'autres formes de transfert d'information à l'intérieur de l'usine afin de générer des réponses systémiques à l'herbivorie.