

Leerlingenhandleiding

Afsluitende module

Wapenwedloop



Ontwikkeld door het Centre for BioSystems Genomics

in samenwerking met Wageningen University

Tekst

Doriet Willemen en Jan-Kees Goud

Illustraties

Wageningen University en University of Toronto (zie verantwoording)

Vormgeving

Identim, Wageningen

Op alle lesmaterialen is de Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/>).
CC BY-NC-SA 2010 – Centre for BioSystems Genomics

Met vragen en/of opmerkingen kunt u contact opnemen met het team Mobile Practica van Wageningen University (dnalabs@wur.nl).

Wapenwedloop

In het practicum van 'Prenataal' onderzoek bij planten heb je onderzocht of jouw aardappelplantje een resistentiegen heeft tegen aardappelmoehed. Deze ziekte wordt veroorzaakt door het aardappelcystenaaltje. Maar een aardappelplant heeft nog veel meer vijanden: allerlei verschillende insecten, schimmels, bacteriën en virussen. Om zich te verdedigen heeft een plant meerdere verdedigingstactieken. Een belangrijke verdedigingstactiek voor de plant is de inzet van een resistentiegen. Maar hoe werkt zo'n resistentiegen nu eigenlijk? Waar codeert het voor? En wat doet een ziekteverwekker ertegen? In deze les gaan we aan de hand van plantenschimmels kijken hoe het zit met resistentiegenen in planten.

Een bijna onneembaar fort

Om te weten te komen hoe een resistentiegen werkt, moet je eerst weten hoe een plant zich normaal gesproken verdedigt tegen een binnendringende ziekteverwekker. Omdat planten niet kunnen weglopen als de vijand nadert, zijn ze erop gebouwd om aanvallers buiten de poort te houden. Zo zijn planten met een dikke cuticula moeilijker binnen te dringen voor sommige ziekteverwekkers dan planten met een dunnere cuticula. Ook beperking van het aantal huidmondjes en de vorm ervan kan ziekteverwekkers tegenhouden. De bacterie *Pseudomonas citri* bijvoorbeeld tast wel grapefruit aan, maar geen mandarijn. De huidmondjes van een mandarijnplant zijn anders van bouw, waardoor de bacterie niet kan binnendringen. Daarna vormt de celwand een barrière. En tot slot kunnen planten allerlei chemische stoffen bevatten waar een ziekteverwekker niet goed tegen kan, zoals polyfenolen en alkaloiden.

Toch heeft elk fort ook zijn zwakke plekken. Er zijn altijd wel één of meerdere ziekteverwekkers die toch een bepaalde plantensoort kunnen binnendringen. Vervolgens kan de indringer in deze plant groeien en zich vermeerderen. Zo'n plantensoort is dan een waardplant voor de betreffende ziekteverwekker. En zo is lang geleden ook tomaat waardplant geworden van de schimmel *Cladosporium fulvum*, de veroorzaker van de bladvlekkenziekte van tomaat.

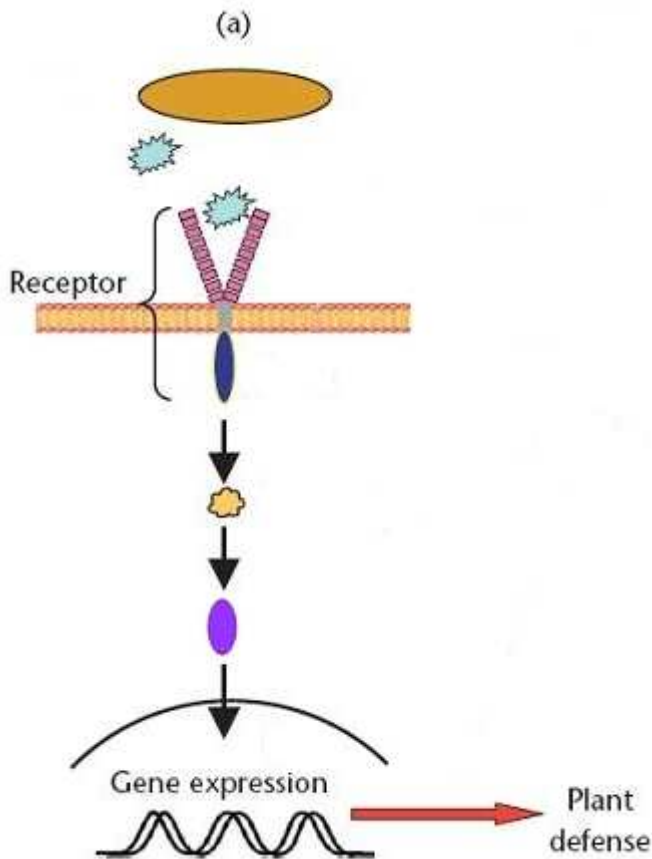


Figuur 1: Schimmeldraden van *Cladosporium fulvum* dringen een huidmondje van tomaat binnen (electronenmicroscopische opname).

De eerste verdedigingslinie

Natuurlijk geeft de plant zich niet zomaar gewonnen. De vijand is dan wel het fort binnengedrongen, maar heeft het nog niet ingenomen. Omdat planten geen antilichamen kunnen aanmaken om vreemde indringers uit te schakelen, hebben ze een andere verdedigingstactiek. Op de buitenkant van een plantencel zitten speciale receptoren. Zo'n receptor is een eiwit dat geschikt is voor het herkennen van specifieke moleculen van ziekteverwekkers. Zodra er een vijandelijk

molecuul is gesignaleerd op de oppervlakte van de plantencel, wordt dit doorgegeven binnen in de cel. In de plantencel start vervolgens een kettingreactie om de verdediging op poten te zetten. Allerlei genen worden overgeschreven en processen in gang gezet. In totaal is wel 30% van alle plantengenen betrokken bij de verdediging tegen ziekteverwekkers. Dit proces is schematisch weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: Schematisch overzicht van de afweer door planten

(a) Een plantenreceptor herkent een ziekteverwekker aan zijn specifieke moleculen. De eerste verdedigingslinie wordt geactiveerd.

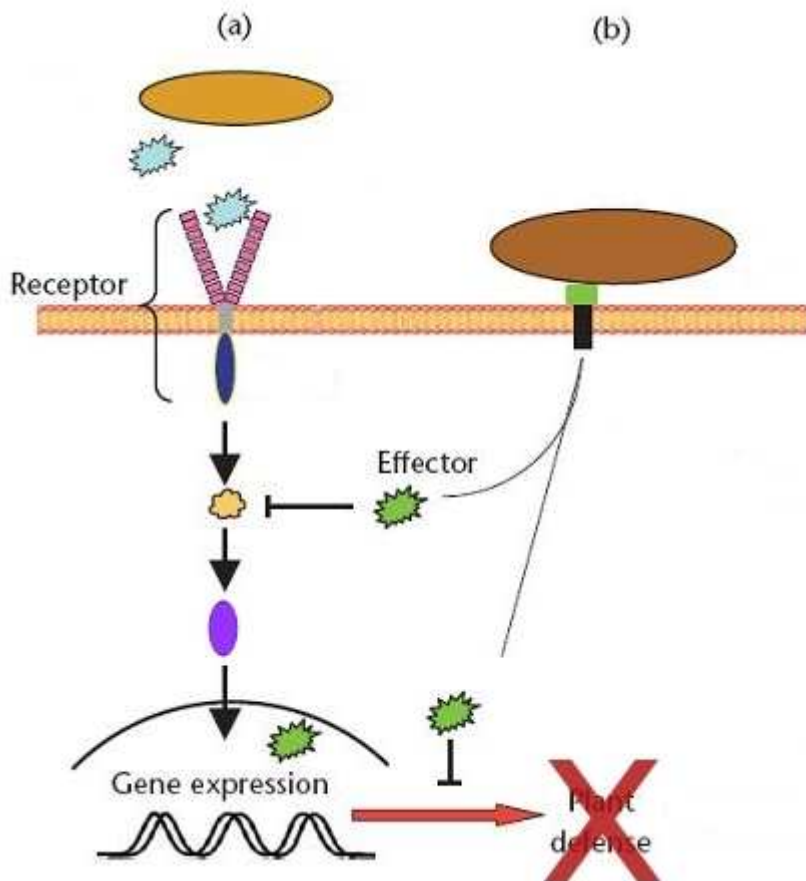
De moleculen die door de plantenreceptor herkend worden zijn vaak van verbindingen die bij bijna alle schimmels voorkomen. Bijvoorbeeld chitine en β -glucanen, waaruit de celwand van schimmels is opgebouwd. Of ergosterol, een bouwstof voor de celmembraan van schimmels. Het zijn meestal specifieke moleculen die aan de buitenkant van de aanvallers voorkomen en daar een essentiële functie vervullen. De plant kan zo met één soort receptor bijna alle schimmels bij het eerste contact direct herkennen.

Nadat de plantenreceptor een vijandelijk molecuul heeft waargenomen, komt de afweerreactie razendsnel op gang. Binnen een paar minuten zet de plant een verdediging op poten. Zo kan hij bijvoorbeeld proberen de schimmel tegen te houden door zijn eigen celwanden te versterken met lignine. Lignine vormt met cellulose een verbinding die ondoordringbaar is voor veel schimmelenzymen. Een andere mogelijkheid is de inkapseling van de binnendringende schimmel. Hierbij maakt de plant callose aan waarmee de schimmel als het ware wordt ingemetseld. Ook effectief is de productie van fytoalexinen en enzymen. Fytoalexinen zijn stoffen die giftig zijn voor de indringer. En enzymen, zoals chitinase, breken de celwand van de schimmel af. Hierdoor kan de schimmel niet verder groeien en is de aanval afgeslagen. Deze basisverdediging met chitinase heeft tomaat gekregen om zich te beschermen tegen de schimmel *Cladosporium fulvum*.

Het schimmeloffensief

Natuurlijk laat de schimmel dit niet op zich zitten en voert een tegenaanval uit. Hiervoor gebruikt hij zogenaamde effectoren. Een effector is een eiwit dat gemaakt en uitgescheiden wordt door de schimmel en dat effect heeft op de verdediging van de plant. Een effectoreiwit wordt gecodeerd door een avirulentiegen (*Avr*-gen).

Effectoren verstoren de verdediging van de plant. Sommige effectoren doen dat door een stap in de afweerreactie van de plant te onderdrukken. In dat geval produceert de schimmel een effector die zijn werk binnen in de plantencel doet. Dit is het geval bij de RxLR-effector van *Phytophthora infestans*, een op schimmel lijkend organisme. Er bestaan een heleboel verschillende RxLR-effectoren, maar allemaal hebben ze ergens in hun aminozuurvolgorde de aminozuren RxLR (arginine-willekeurig-leucine-arginine) achter elkaar. Dit RxLR-motief werkt als een soort postcode die de effector naar de binnenkant van de plantencel stuurt. Daar aangekomen kan elke effector op zijn eigen manier de verdediging van de aardappelplant saboteren. Dit is schematisch weergegeven in figuur 3b.



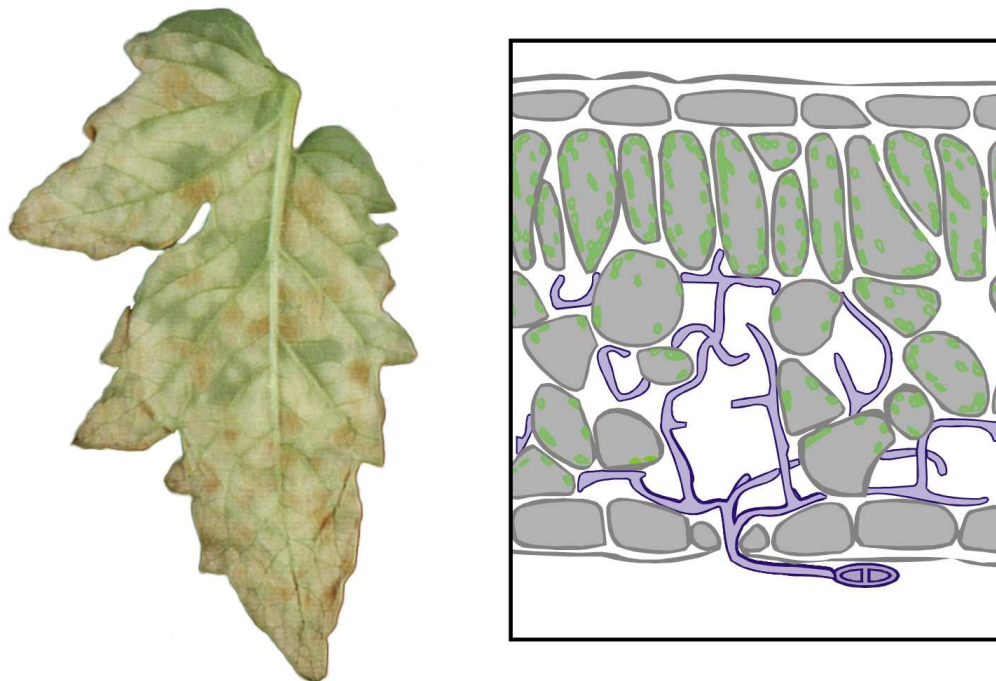
Figuur 3: Schematisch overzicht van de afweer door planten

(a) Een plantenreceptor herkent een ziekteverwekker aan zijn specifieke moleculen. De eerste verdedigingslinie wordt geactiveerd.

(b) Een ziekteverwekker scheidt effectoren af, die de verdediging van de plant verstoren.

Maar een effector kan ook op een andere manier de verdediging van een plant verstoren. Dit is bijvoorbeeld het geval bij de bladvlekkenziekte van tomaat. De schimmel *Cladosporium fulvum* heeft het avirulentiegen *Avr4*. Dit codeert voor effector *Avr4* en is een chitine-bindend eiwit. Doordat effector *Avr4* aan de chitine van de schimmel bindt wordt de schimmel beschermd tegen

het chitinase van de tomatenplant. In dit geval vormt de effector dus een soort schild om de schimmel tegen de wapens van de plant te beschermen.



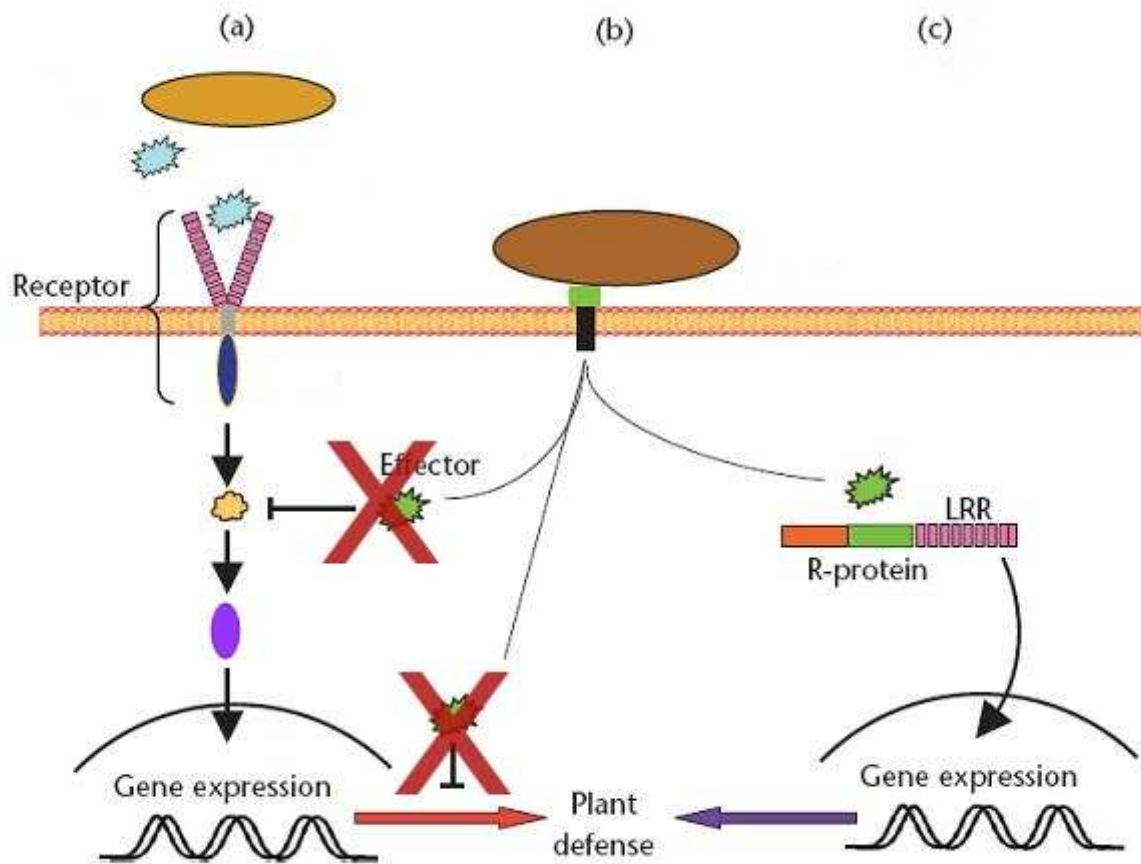
Figuur 4: Tomatenblad geïnfecteerd met *Cladosporium fulvum* (bladvlekkenziekte).

De situatie voor een schimmel nog even samengevat:

Avr-gen	effector	afweer plant	verstoord	infectie
geen Avr-gen	geen effector	afweer plant	intact	geen infectie

De bewakers

Nu is het eindelijk zover dat de plant zijn geheime wapen gaat inzetten: het resistentiegen (*R*-gen). Een resistentiegen codeert voor een resistentie-eiwit (*R*-eiwit). *R*-eiwitten zijn eigenlijk een soort bewakers van de eerste verdedigingslinie. *R*-eiwitten herkennen de aanwezigheid van een effector van een schimmel en slaan alarm. Het gevolg is dat de plant een andere, nieuwe verdediging opstart, de overgevoeligsreactie. Dit is schematisch weergegeven in figuur 5.



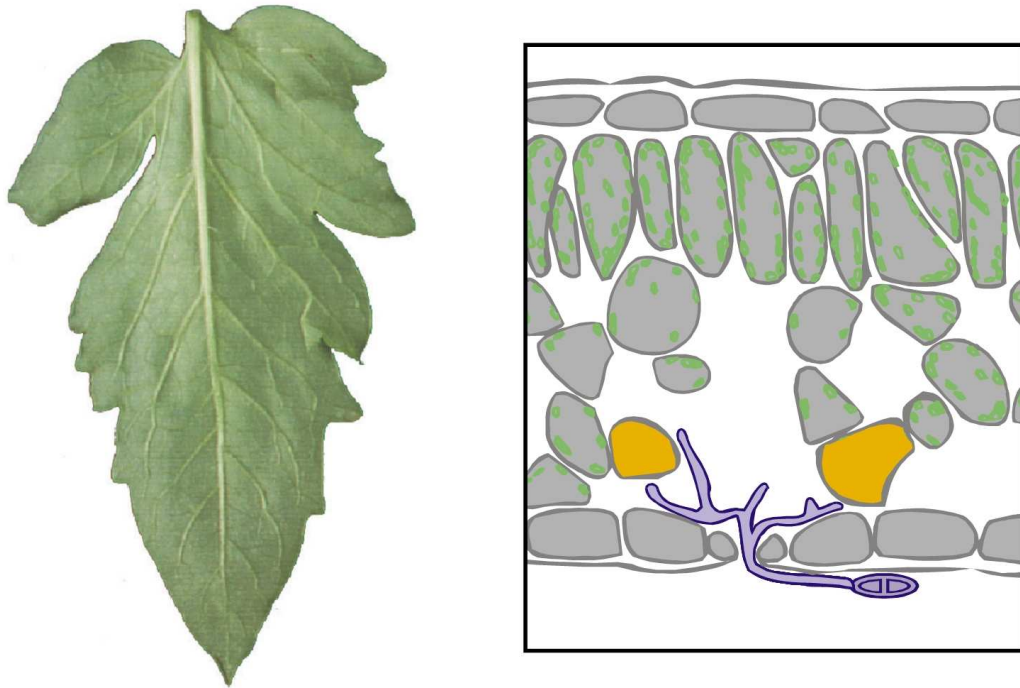
Figuur 5: Schematisch overzicht van de afweer door planten

(a) Een plantenreceptor herkent een ziekteverwekker aan zijn specifieke moleculen. De eerste verdedigingslinie wordt geactiveerd.

(b) Een ziekteverwekker scheidt effectoren af, die de verdediging van de plant verstoren.

(c) Het R-eiwit van de plant herkent de aanwezigheid van een effector en activeert de overgevoelighedsreactie.

De overgevoelighedsreactie werkt als volgt: de plant laat zijn eigen aangevallen cellen snel afsterven. Doordat de plantencel doodgaat wordt de schimmel gestopt. De schimmel is immers een parasiet en heeft voedingsstoffen uit de plantencel nodig om te kunnen groeien. Het kost de plant een klein stukje blad, maar de schimmelaanval is afgeslagen en de plant blijft gezond.



Figuur 6 : Bij een resistente tomatenplant sterven door de overgevoelighedsreactie een paar bladcellen af wanneer de schimmel *C. fulvum* de plant binnendringt. Hierdoor wordt de schimmel gestopt en blijft de rest van het blad (en de plant) gezond.

In het geval van tomaat die zich tegen *C. fulvum* moet beschermen is het als volgt gegaan: tomaat heeft het resistentie-gen *Cf-4*, dat codeert voor R-eiwit Cf-4. Cf-4 herkent effector Avr4 en start de overgevoelighedsreactie op, met als resultaat een resistente tomatenplant.

Nog even de situatie voor een plant samengevat:

R-gen	R-eiwit	Herkenning effector	overgevoelighedsreactie	resistent
geen R-gen	geen R-eiwit	geen herkenning effector	geen overgevoelighedsreactie	vatbaar

Opdracht 1

Zoek bij elk van de onderstaande termen de goede omschrijving (uit A t/m I).

1. waardplant
2. receptor
3. effector
4. avirulentiegen
5. resistentiegen
6. resistentie-eiwit
7. overgevoelighedsreactie
8. resistentie
9. vatbaarheid

- A. Schimmeliwit dat de afweer van een plant saboteert.
- B. Vermogen van een waardplant om de infectie door een ziekteverwekker te bemoeilijken.
- C. Een plantaardig organisme dat als gastheer dient voor een ander organisme.
- D. Planteneiwit dat schimmleeffector herkent en de overgevoelighedsreactie in gang zet.

- E. Genetische basis van resistentie in een plant.
- F. Onvermogen van een waardplant om infectie door een ziekteverwekker te verhinderen.
- G. De tegenhanger in een schimmel van het resistentiegen bij een plant.
- H. Eiwit op de buitenkant van een plantencel dat veel schimmels herkent.
- I. Het gecontroleerd afsterven van enkele plantencellen als verdediging tegen een ziekteverwekker.

Wapenwedloop

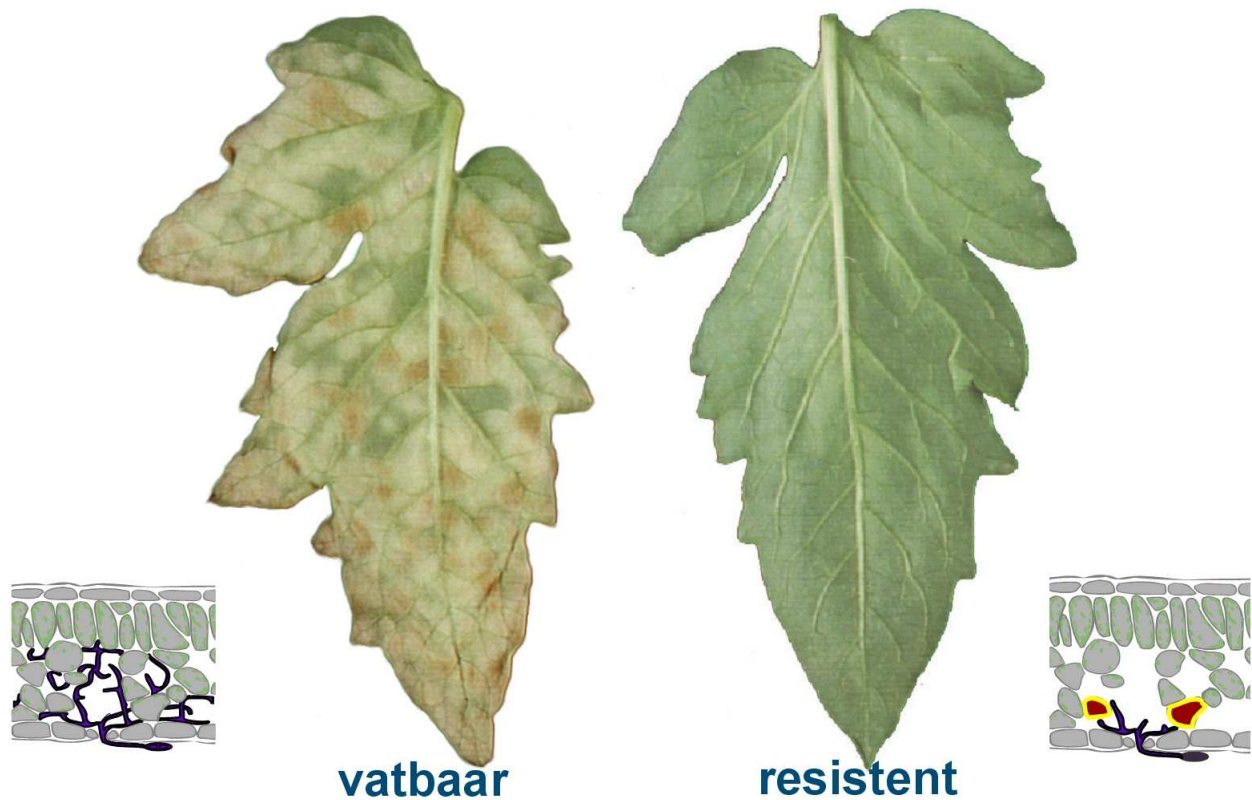
Vanaf dit punt in de evolutie begint een ware wapenwedloop tussen plant en ziekteverwekker. De schimmel gaat op zoek naar een “undercover effector”. Hij probeert zijn effector zo te veranderen dat hij nog wel functioneert, maar dat de plant hem niet meer herkent. Zonder herkenning kan de effector ongestoord zijn gang gaan en is de plant weer vatbaar (de resistentie is doorbroken). De plant probeert zich vervolgens te wapenen met een nieuw R-eiwit dat de undercover-effector wel herkent en uitschakelt. Dan is de schimmel weer aan zet enzovoort, enzovoort... Deze wapenwedloop is gebaseerd op de gen-om-gen theorie. Dat houdt in dat elk R-gen van de plant matcht met een avirulentiegen van de schimmel. Planten die de effector van de schimmel herkennen zijn dan resistent als gevolg van de overgevoeligheidsreactie. Planten die de effector niet herkennen zijn vatbaar voor de schimmel. Een schimmel met het juiste avirulentiegen kan het matchende resistentiegen van de plant omzeilen en de plant infecteren.

		R gene			
		Cf-2	Cf-4	Cf-4E	Cf-9
Avr gene	Avr2	HR			
	Avr4		HR		
	Avr4E			HR	
	Avr9				HR

Figuur 7 : Gen-om-gen relaties tussen resistentiegenen van tomaat en avirulentiegenen van *C. fulvum*. Een passende match tussen een R-gen en een Avr-gen levert, via een overgevoeligheidsreactie (HR), een resistente plant op. Bij alle andere combinaties is de plant vatbaar.

Het doorbreken van de resistentie van de plant door de schimmel kan per toeval gebeuren. Stel dat er bij één schimmel-individu een mutatie optreedt in één willekeurig nucleotide van het Avr-gen. Door deze genmutatie verandert er één aminozuur van de effector. Het kan zo uitpakken dat door deze mutatie de effector niet meer functioneert. De schimmel zal dan niet verder kunnen groeien. Maar wat nu als het zo uitpakt dat de effector nog steeds zijn werk kan doen, maar door de mutatie niet meer herkend wordt door het R-eiwit? In dat geval is de gemuteerde schimmel sterk in het voordeel ten opzichte van de andere schimmelindividuen en zal zich dan ook sneller kunnen uitbreiden. Zo ontstaat er een nieuwe variant binnen de schimmelsoort met een eigen avirulentiegen. Zo'n groep noem je een fysio. Dit is ook gebeurd bij *C. fulvum*: een puntmutatie in

avirulentiegen *Avr4* levert een effector op die nog wel chitine bindt, maar niet meer herkend wordt door de bewaker Cf-4.



Figuur 8: De wapenwedloop tussen avirulentiegenen van de ziekteverwekker en resistentiegenen van de plant bepaalt of een plant vatbaar of resistent is.

Opdracht 2

De relatie tussen de waardplant tomaat en de ziekteverwekkende schimmel *Cladosporium fulvum* evolueert in de loop der tijd. Zet de verschillende stappen in de evolutie van tomaat en *Cladosporium fulvum* op een rijtje.

Het is niet zo dat bij elk schimmelfysio een mutatie optreedt in steeds hetzelfde avirulentiegen. Er bestaan allerlei verschillende avirulentiegenen die ook verschillende aangrijpingspunten kunnen hebben. Een fysio kan ook meerdere avirulentiegenen tegelijk hebben, net zoals een plant ook meerdere resistentiegenen kan hebben.

Bij planten zorgt natuurlijke selectie voor het ontstaan van verschillende resistentiegenen. Maar de mens probeert zijn cultuurgewassen een handje te helpen door plantenveredeling. Bijvoorbeeld tegen de aardappelziekte *Phytophthora infestans*. Vooral in wilde aardappelplanten uit het Andesgebergte in Zuid-Amerika komen veel verschillende *R*-genen tegen deze ziekteverwekker voor. Veredelaars proberen door het kruisen van wilde resistente planten met gecultiveerde vatbare planten om nieuwe resistente rassen te kweken. Een ras is een genetisch uniforme groep individuen binnen een plantensoort met specifieke kenmerken, zoals een bepaald resistentiegen. Een nadeel van veredeling is dat het veel tijd kost, terwijl *Phytophthora infestans* zich erg snel kan aanpassen. Hierdoor wordt de resistentie relatief snel weer doorbroken.

Opdracht 3

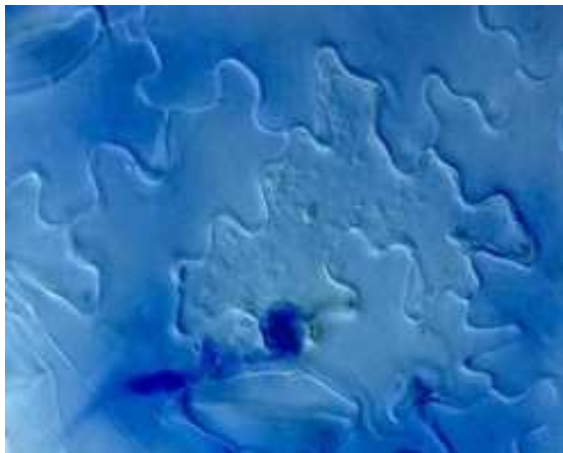
Stel, je hebt de aardappelrassen A, B, C, D en E. Ras A heeft geen resistentiegenen (R_0). Ras B heeft resistentiegen R_1 , ras C heeft R_2 , ras D heeft R_4 en ras E heeft R_1 en R_3 . Er zijn verschillende fysio's van een ziektenverwekkende schimmel bekend. Fysio a heeft avirulentiegen Avr_1 , fysio b heeft avirulentiegen Avr_2 , fysio c heeft 2 avirulentiegen Avr_1 en Avr_2 en fysio d heeft avirulentiegen Avr_3 .

Maak een schema, zoals in figuur 7, waarin je de rassen en fysio's tegen elkaar uitzet en van elke combinatie aangeeft of het een resistente plant (R) of vatbare plant (V) oplevert.

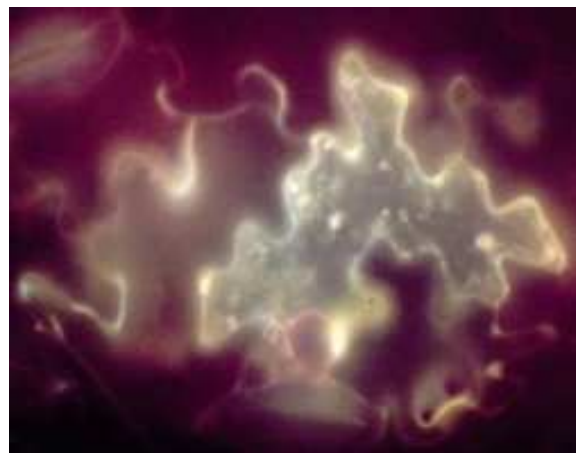
Slimme strategie

Zoals eerder verteld, werken de R-eiwitten als bewakers die de aanwezigheid van schimmeffectoren herkennen. Dat kan door directe herkenning: het bewaker R-eiwit herkent de specifieke effector. Maar het kan ook op een indirecte manier.

In dat geval houdt het bewaker R-eiwit de structuur in de gaten van plantenmoleculen die een rol spelen in de eerste verdedigingslinie. Als er een effector de plant binnenkomt gaat die een interactie aan met een molecuul uit de eerste verdedigingslinie. Daardoor verandert de structuur van het verdedigingsmolecuul. Het R-eiwit herkent dat er iets aan de hand is met het verdedigingsmolecuul en start de overgevoeligheidsreactie op.



9A: normaal licht



9B: UV-licht

*Figuur 9: Microscopische opname van de overgevoeligheidsreactie bij resistente aardappel na contact met *Phytophthora infestans*. Doordat enkele bladcellen rondom de ziekteverwekker afsterven wordt de infectie gestopt en blijft de rest van het blad (en de plant) gezond.*

9A: Onder normaal licht is de ziekteverwekker zichtbaar als het donkerblauwe bolletje (appressorium) met daaraan de hyfe of schimmeldraad.

9B: Onder UV-licht zijn de dode plantencellen duidelijk zichtbaar door de afwijkende, wittere kleur.

Resistentie-eiwitten kunnen op allerlei plaatsen in of aan de buitenkant van de plantencel voorkomen. Er bestaan een heleboel verschillende soorten R-eiwitten, maar de meeste hebben één overeenkomst: een leucine rijke regio (LRR). Dit is een gebied op het R-eiwit waar het aminozuur leucine vaak achter elkaar in voorkomt. Deze LRR speelt een rol bij de binding aan andere moleculen en zodoende bij de herkenning van structuurveranderingen.

De indirecte herkenning van effectoren, namelijk via structuurverandering van de eigen plantenmoleculen, is voor de plant een handig systeem. De plant hoeft alleen zijn eigen verdediging in de gaten te houden en hoeft zich niet aan te passen aan allerlei verschillende, evoluerende schimmeffectoren. Voor de schimmel is het juist veel lastiger: hij moet vechten tegen een vijand achter de schermen. Hij moet zich aanpassen aan iets waar hij geen directe interactie mee heeft.

Opdracht 4:

Bedenk twee veredelingstrategieën om het een schimmel moeilijker te maken om de resistentie van een *R*-gen snel te doorbreken.

Bijlage 1: Verdiepingsopdrachten (facultatief)

Kies één van onderstaande onderwerpen. Lees de artikelen en vertel in een korte presentatie aan de rest van de klas waar het onderwerp over gaat.

1. Kunnen tomaten de banaan redden van Black Sigatoka?

<https://www.nemokennislink.nl/publicaties/zwarte-sigatoka-schimmel-belaagt-bananenteelt-verdwijnt-de-banaan-van-ons-menu>

en

<http://www.nporadio1.nl/nieuws-en-co/onderwerpen/376191-tomaat-redt-banaan>.

2. De Principes van Plantenveredeling

<https://www.nemokennislink.nl/publicaties/de-principes-van-de-plantenveredeling>

en

!! nieuwe link kwekersspel: <https://www.wur.nl/nl/show/Software-Kwekers-Spel-1.htm>

3. Gentech frietjes?

<https://www.nemokennislink.nl/publicaties/operatie-aardappel-overrompeld>

en

<https://www.nemokennislink.nl/publicaties/gentech-frietje-ja-graag>

4. Zwarte roest op je boterham

<https://www.naturetoday.com/intl/nl/nature-reports/message/?msg=18047>

en

<https://dekennisvanu.nl/site/artikel/Nieuw-wapen-tegen-zwarte-roest/6586>

en

<http://www.ipsnews.be/artikel/agressieve-schimmel-bedreigt-graanoogst-europa-afrika-en-azie>

Bijlage 2: Illustratieverantwoording

- Figuur 1.....Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University;
<http://www.php.wur.nl/UK/Research/> (bezocht juli 2010).
- Figuren 2, 3 en 5University of Toronto, bewerkt door D. Willemen en J-K. Goud;
<http://bio349.biota.utoronto.ca/20099/20099bio349mike/bacteria.html> (bezocht juli 2010).
- Figuren 4, 6, 8 en 9Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University.
- Figuur 7Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen University;
<http://www.php.wur.nl/UK/Research/Cladosporium/> (bezocht juli 2010).