

Naam:
Studentnummer:

Niveau 2 cursus Microbiele Interacties

Vraag 1

Tijdens de evolutie hebben planten ingenieuze afweermechanismen ontwikkeld waarmee ze in staat zijn zich te verdedigen tegen een breed scala aan belagers zoals herbivore insecten, virussen, bacteriën, schimmels, oomyceten en nematoden. Veel van die verdedigingsmechanismen zijn latent aanwezig in de plant en worden alleen in stelling gebracht nadat de plant een interactie is aangegaan met een micro-organisme. Dit wordt ook wel geïnduceerde resistentie genoemd. Drie vormen van geïnduceerde resistentie zijn goed onderzocht: 1) "systemic acquired resistance" (SAR), 2) "induced systemic resistance" (ISR), en "wound-induced resistance" (WIR).

- a. Benoem in de onderstaande tabel de belangrijkste karakteristieken van SAR, ISR en WIR.

	Biologische inducer?	Effectief tegen?	Belangrijkste hormo(o)n(en)	Andere karakteristieken?
SAR				
ISR				
WIR				

- b. Onderzoekers aan de Universiteit Utrecht hebben de rol van de plantenhormonen jasmonzuur (JA) en salicylzuur (SA) onderzocht in de directe afweer van *Arabidopsis thaliana* planten tegen de herbivore insecten *Pieris rapae* (kleine koolwitje; specialist) en *Spodoptera exigua* (Florida mot; generalist). Hierbij hebben ze gebruik gemaakt van wild-type *Arabidopsis Col* planten, mutante *coi1* planten die niet in staat zijn om op JA te reageren, en transgene NahG planten die SA volledig afbreken op het moment dat het gevormd wordt. Jonge larven van *P. rapae* en *S. exigua* zijn vervolgens op deze drie genotypen van *Arabidopsis* gezet en na 10 dagen is het versgewicht van de insecten-larven bepaald. De resultaten van deze proef staan weergegeven in Figuur 1. Welke conclusies konden de onderzoekers trekken uit dit onderzoek over de rol van de plantenhormonen SA en JA in de directe afweer tegen *P. rapae* en *S. exigua*?

Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vervolg vraag 1b:

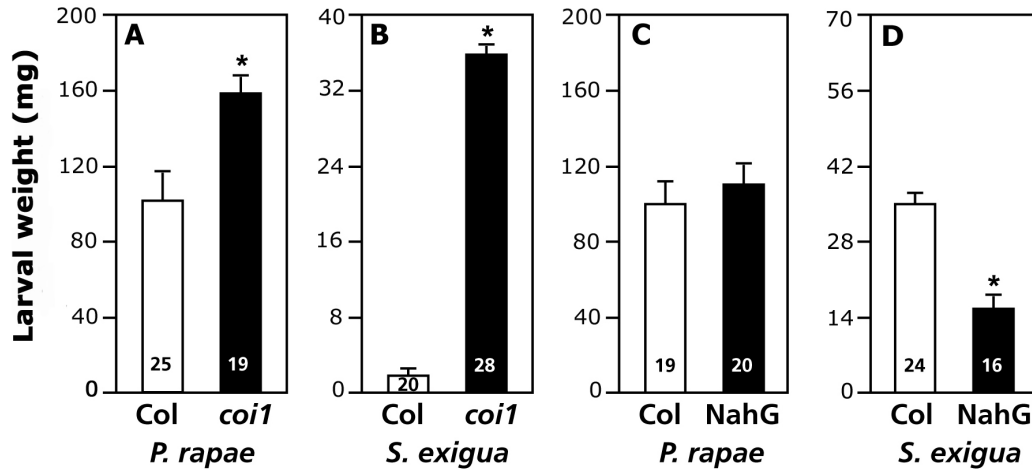


Figure 1. Growth of *P. rapae* and *S. exigua* on Arabidopsis genotypes affected in JA or SA signaling (from Van Oosten et al., 2008: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 913-930).

Young larvae were allowed to feed on single plants. The data presented are the average weight of *P. rapae* larvae after 10 days of feeding on Col-0 and *coi1* or NahG plants (A, C) and *S. exigua* larvae after 10 days of feeding on Col-0 and *coi1* or NahG (B, D) plants. The data shown are means \pm SE (n = 16-28) of the weights of the caterpillars. Asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) according to Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney U tests. The number of caterpillars weighed (n) is given in the bar. Experiments were repeated with similar results.

Naam:
Studentnummer:

Vervolg Vraag 1

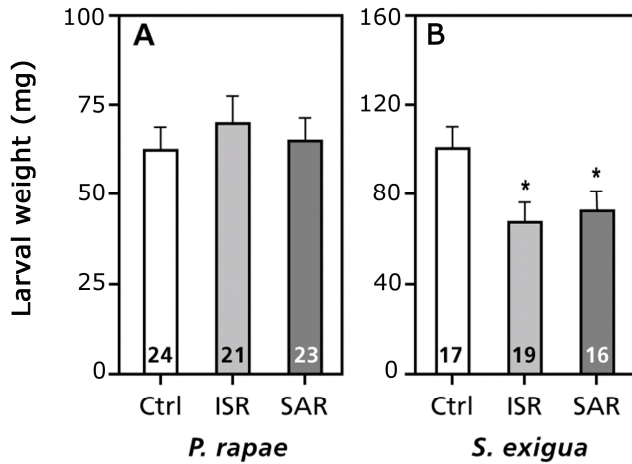


Figure 2. Growth of *P. rapae* and *S. exigua* on wild-type Arabidopsis Col-0 plants expressing microbially induced ISR or SAR.

Young larvae were placed on individual plants that were either uninduced (Ctrl) or expressing ISR or SAR. ISR was induced by the *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, SAR was induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000(avrRpt2). Ten days later, their growth was monitored. The data shown are means \pm SE of the weights of the caterpillars after 10 days of feeding by *P. rapae* (A) or *S. exigua* (B). Asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) based on Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney U tests. The number of caterpillars weighed (n) is given in the bar. Each experiment was performed at least twice with similar results.

- c. In dezelfde studie hebben de Utrechtse onderzoekers gekeken of de geïnduceerde resistentie zoals geactiveerd door microorganismen tijdens ISR en SAR effectief is tegen de herbivore insecten *P. rapae* en *S. exigua*. De resultaten van deze studie staan weergegeven in Figuur 2. Er is een duidelijk verschil tussen de resultaten met *P. rapae* en *S. exigua*. Geef hiervoor een verklaring. Maak hierbij gebruik van het gegeven dat *P. rapae* een specialist (komt op enkele plantensoorten voor) is en *S. exigua* een generalist (komt op heel veel plantensoorten voor).
- d. De resultaten in Figuur 2B waren voor de betrokken onderzoekers nogal onverwacht. Vind jij dat ook? Beargumenteer je antwoord.

Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vraag 2

Pseudomonas fluorescens stam E10 (Pf-E10) heeft het vermogen om, na kolonisatie van de wortels, in *Arabidopsis thaliana* ziekte te onderdrukken die veroorzaakt wordt door de bodemschimmel *Fusarium oxysporum* alsmede de ziekte die veroorzaakt wordt door het bacteriële bladpathogeen *Pseudomonas syringae*. Uit onderzoek blijkt dat Pf-E10 een specifiek lipopolysaccharide (LPS) patroon heeft en in staat is salicylzuur (SA) alsmede een pseudobactine type siderofoor (PSB) te produceren.

- a. Welke mechanismen spelen mogelijk een rol bij de onderdrukking van ziekte die veroorzaakt wordt door *F. oxysporum*? Beargumenteer het antwoord.

- b. Welke mechanismen spelen mogelijk een rol bij de onderdrukking van de ziekte die veroorzaakt wordt door *P. syringae*? Beargumenteer het antwoord.

Met behulp van transposon mutagenese zijn mutanten van Pf-E10 gemaakt die de O-antigene zijketen van het LPS missen (OA⁻), die geen salicylzuur produceren (SA⁻), of die geen pseudobactine produceren (PSB⁻). In twee biotoetsen wordt onderzocht in hoeverre kolonisatie van de wortels door Pf-E10 en de drie mutanten Pf-E10(OA⁻), Pf-E10(PSB⁻) en Pf-E10(SA⁻) de ziekten in *Arabidopsis* kunnen onderdrukken die veroorzaakt worden door respectievelijk *F. oxysporum* en *P. syringae*. In tabel 1 staan de gevonden resultaten weergegeven.

Tabel: Percentage zieke planten na infectie met *F. oxysporum* of *P. syringae*. Verschillende letters binnen één kolom geven statistisch significante behandelingsverschillen aan.

	Fusarium oxysporum	Pseudomonas syringae
Controle	75 ^a	80 ^a
Pf-E10	30 ^c	42 ^c
Pf-E10(OA⁻)	32 ^c	60 ^b
Pf-E10(PSB⁻)	51 ^b	40 ^c
Pf-E10(SA⁻)	29 ^c	59 ^b

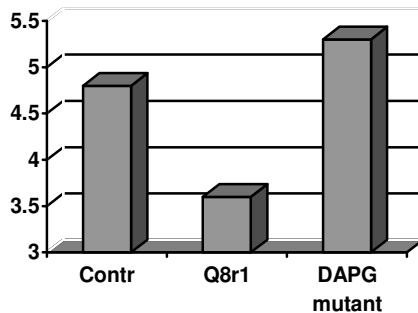
Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vraag 3

Onderdrukking van *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, de veroorzaker van take-all in tarwe, door *Pseudomonas fluorescens* Q8r1 berust op de productie van 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) door Q8r1 (zie onderstaande figuur).

ziekte index



Figuur

Effect van behandeling van tarwezaad met *P. fluorescens* Q8r1 en een DAPG negatieve mutant van Q8r1 op het optreden van take-all. De ziekte index loopt van 1 tot 6, waarbij 1= volledig gezond en 6= dood.

- Waarom hebben de onderzoekers juist de rol van DAPG onderzocht en niet die van een ander antibioticum dat door fluorescerende pseudomonaden wordt geproduceerd?
- Beschrijf kort hoe je experimenteel zou kunnen onderzoeken of quorum sensing een rol speelt bij deze ziekteonderdrukking?

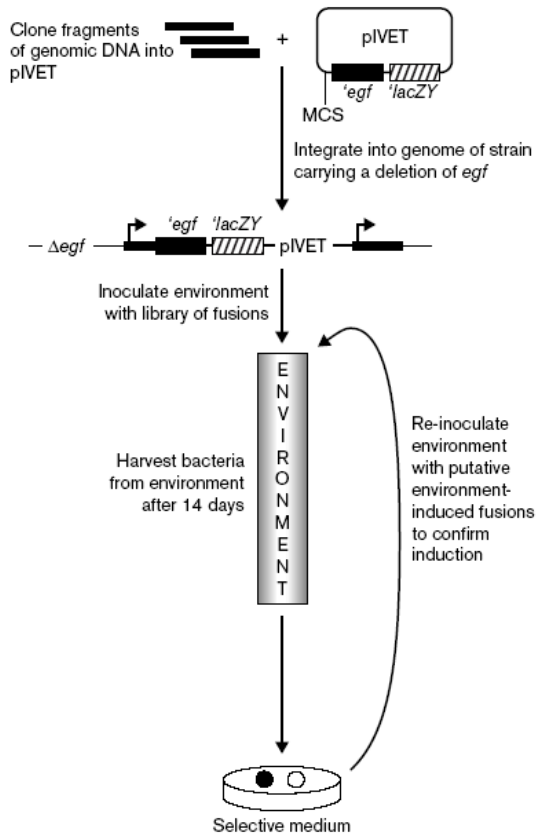
Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vraag 4

Om virulentiefactoren van de bacterie *Staphylococcus aureus* te identificeren gebruikt men de IVET techniek. (Zie onderstaande afbeelding). Men doet het experiment in muizen.

a) Leg in eigen woorden uit hoe deze techniek werkt (geef hierbij in ieder geval aan wat de functie is van het *egf* gen en het *lacZY* gen).



b) Geef een nadeel van deze IVET techniek.

Naam:
Studentnummer:

Vervolg Vraag 4

c) Men identificeert een gen dat codeert voor een protease. Om te bepalen of het protease een rol speelt in virulentie maakt men een mutant in het protease gen en test men de LD₅₀ in muizen. Leg uit hoe dit experiment wordt gedaan en of de LD₅₀ hoger of lager wordt.

d) Verder onderzoek toont aan dat het protease alleen wordt gemaakt wanneer er geen ijzer is. De verantwoordelijke regulator werkt via negatieve regulatie met repressie. Leg uit hoe deze regulatie werkt.

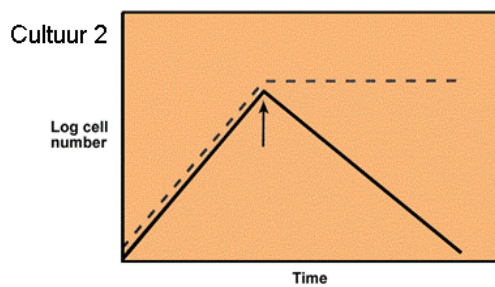
Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vraag 5

Bacterie stam A maakt een antibioticum dat bacterie stam B remt in zijn groei.

- a) Hoe noem je deze vorm van interactie. Licht je antwoord toe.
- b) In de figuur zie je het effect van het antibioticum op de groei van stam B. De doorgetrokken lijn is het aantal cellen bepaald met de plaattel methode en de gestippelde lijn is het aantal cellen bepaald met de spectrofotometer. Wat is de werking van dit antibioticum, bacteriocidaal, bacteriolytisch of bacteriostatisch? Licht je antwoord toe.



- c) Het antibioticum heeft als target het enzym gyrase. Noem nog twee andere targets waar antibiotica vaak op aangrijpen.
- d) Wanneer je een cultuur van stam B uitplaat op een voedingsbodem met het antibioticum krijg je een klein aantal kolonies die resistent zijn tegen het antibioticum. Welk resistentie mechanisme is hierbij waarschijnlijk van belang? Licht je antwoord toe.

Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven

Naam:
Studentnummer:

Vraag 6

Men wil een vaccin ontwikkelen tegen de Gram-negatieve bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Men is hierbij opzoek naar geëxposeerde eiwitten van deze bacterie die gebruikt kunnen worden in een subunit vaccin. Men heeft een gen gevonden dat waarschijnlijk codeert voor een buitenmembraan eiwit.

- a) Men wil eerst weten wat de functie is van het eiwit en probeert een mutant te maken. Dit blijkt niet mogelijk te zijn. Leg uit wat hiervan de reden kan zijn en hoe je toch de functie van dit eiwit kan bestuderen.

- b) Vervolgens wil men kijken of het eiwit niet te veel onderhevig is aan antigene variatie. Leg uit wat dit is en bedenk een experiment hoe je dit zou kunnen bepalen.

- c) Ten slotte zuivert men het eiwit en injecteert het eiwit in muizen. Men test of de muizen bactericide antilichamen maken. Antilichamen alleen zijn eigenlijk niet bactericidaal. Noem drie functies van antilichamen en geef aan welke functie van belang is bij bactericide antilichamen.

Gebruik indien nodig ook de achterkant om je antwoord op te schrijven