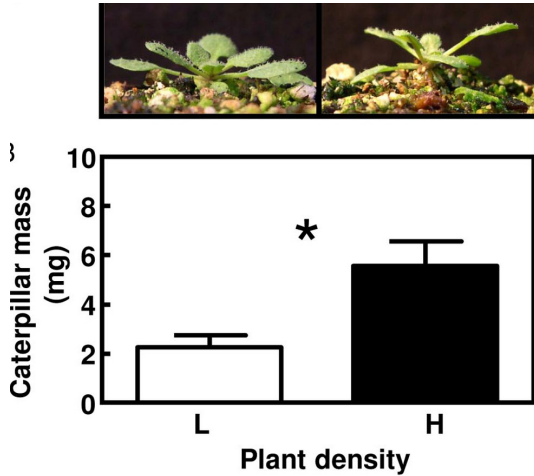


Vraag 1.

Twee weken geleden werd een artikel gepubliceerd over interacties tussen shade avoidance en afweer (Moreno *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009).

In figuur 1a zie je dat deze interactie optreedt, waarbij duidelijk is dat de inductie van shade avoidance in *Arabidopsis* ten koste gaat van afweer tegen een herbivoor (de rups van *Spodoptera frugiperda*).



Figuur 1a. *Arabidopsis* planten in lage (L) en hoge (H) plantdichtheid. Bij hoge dichtheid treden shade avoidance reacties op, zoals petioolstrekking en hyponastie, en zijn de planten meer aantrekkelijk voor de herbivoor *Spodoptera frugiperda*, uitgedrukt in rups-biomassa.

- a) Beschrijf een experiment om te achterhalen via welk buurplant-detectie signaal de onderdrukking van afweer optreedt.

Vervolg vraag 1:

- b) De onderzoekers hadden op hun eigen manier ontdekt dat de rood/verrood verhouding bepalend was voor de interactie uit figuur 1a en wilden vervolgens meer van het mechanisme van deze trade-off begrijpen. Daartoe voerden zij een proef uit waarvan de data staan weergegeven in figuur 1b. Wat zou volgens jou de conclusie moeten zijn aangaande de vraag of auxine de regulator van de interactie tussen shade avoidance en afweer zou kunnen zijn?

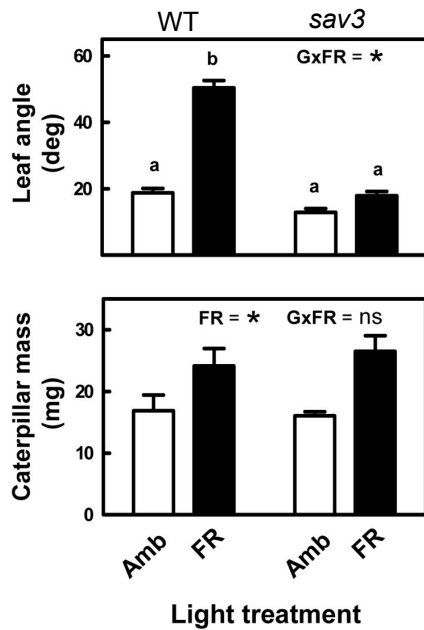


Fig. 1b. Verlaging van de rood/verrood verhouding (door toediening van verrood (FR) aan de standaard achtergrond belichting (Amb, van ambient)) leidt tot shade avoidance (hyponastie) in wild-type Arabidopsis (WT, linker twee balkjes), maar niet in de sav3 mutant (rechter twee balkjes). Deze mutant heeft onder controle condities ongewijzigde auxine concentraties, maar kan deze niet verhogen tijdens laag rood/verrood condities. Performance van de herbivoor is weergegeven als massa van de rups.

Vervolg vraag 1:

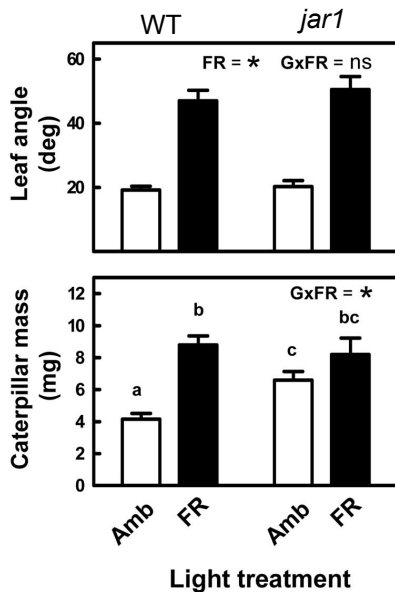


Fig. 1c. Verlaging van de rood/verrood verhouding (door toediening van verrood (FR) aan de standaard achtergrond belichting (Amb, van ambient)) leidt tot shade avoidance (hyponastie) in zowel wild-type Arabidopsis (linker twee balkjes), als de jasmonzuur ongevoelige mutant jar1 (jasmonate resistent) (rechter twee balkjes). Performance van de herbivoor is weergegeven als massa van de rups.

- c) Geef op basis van figuur 1c aan of de onderdrukking van de afweer route tijdens shade avoidance waarschijnlijk upstream of downstream plaatsvindt van jasmonzuur.

Vraag 2.

In een onderzoek naar twee ecotypes van de Noord-Amerikaanse plantensoort *Stellaria longipes* werd ontdekt dat deze twee ecotypes verschillende shade avoidance eigenschappen bezitten (Sasidharan *et al.* Plant Physiology, 2008).

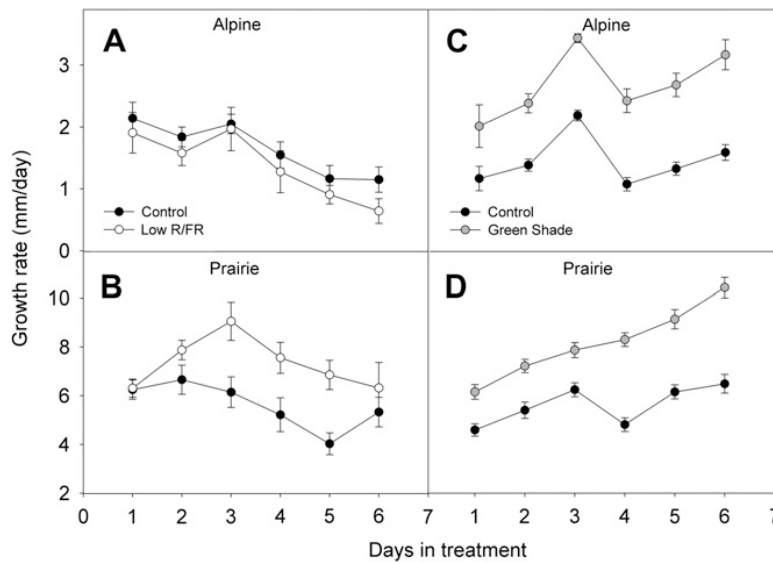


Fig. 2a. Stem elongation rates of two *Stellaria longipes* ecotypes: an alpine (unproductive, open vegetations, high in the mountains) and a prairie (productive grasslands in the lowlands) ecotype. Plants were either exposed to control light versus light with a reduced red:far-red ratio (panels A & B), or to control light versus green shade (panels C & D), the latter mimicking deep shade inside a dense vegetation.

- a) Leg uit of het gevonden verschil in shade avoidance eigenschappen dat te zien is in Fig 2a, correspondeert met de verschillen in habitats waarin deze twee ecotypes van oorsprong voorkomen.

Vervolg vraag 2:

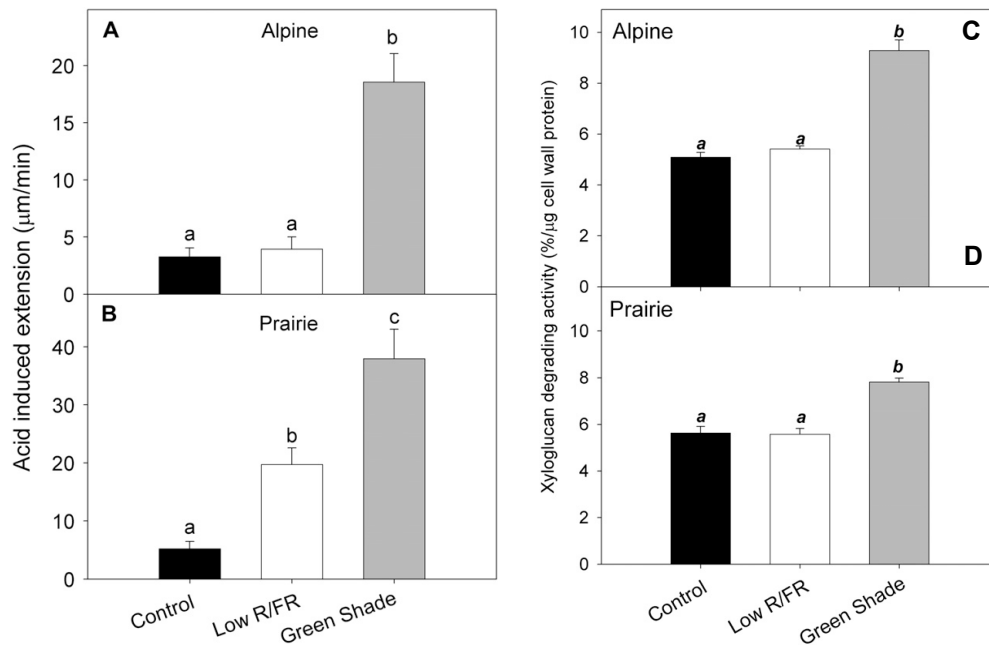


Fig. 2b. Acid-induced extension (physiological measure for expansin activity, panels A & B) and xyloglucan degrading activity (physiological measure for XTH's, panels C & D) for the alpine (panels A & C) and prairie (panels B & D) ecotypes of *Stellaria longipes* in control light, low red:far-red light ratio and green shade (deep shade).

- b) Leg op basis van figuren 2a en 2b uit of volgens jou expansines of juist XTH's waarschijnlijk de regulators zijn van celgroei tijdens shade avoidance in *Stellaria longipes*.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009

Vervolg vraag 2:

Zoals bekend heeft de Universiteit Utrecht een master *Environmental Biology*, met daarin een mooi *Plant Biology* track. In die masteropleiding doe je veel onderzoek bij leerstoelgroepen naar keuze. Het onderzoek waaruit de figuren bij deze tentamenvraag zijn gehaald, is uitgevoerd door een van die leerstoelgroepen (Ecofysiologie van Planten). Nu is dit onderzoek nog niet af en in de volgende twee deelvragen wordt je uitgenodigd om experimenten te verzinnen die evt. door Masterstudenten in hun projecten zouden kunnen worden uitgevoerd.

- c) De data die je in deze vraag te zien hebt gekregen suggereren een verband tussen shade avoidance reacties en de regulatie door celwand eiwitten. Echter dit zijn correlatieve data. Beschrijf een experiment waarmee je zou kunnen aantonen dat er daadwerkelijk een causaal verband is tussen deze eiwitten en shade avoidance. Met andere woorden, beschrijf een experiment waarin je kunt aantonen of die celwand eiwitten daadwerkelijk bepalend zijn voor het al dan niet kunnen verlopen van strekkingsgroei tijdens shade avoidance. Je mag hierbij ook gebruik maken van andere plantensoorten, zoals bijv. *Arabidopsis*.
- d) Beschrijf een experiment om te testen of de verschillende shade avoidance eigenschappen van de twee ecotypes daadwerkelijk adaptief (functioneel) zijn onder natuurlijke omstandigheden.

Vraag 3

Plantenwortels zijn in de natuur gekoloniseerd door een groot aantal bodembacteriën. Deze bacteriën leven op de exudaten die worden uitgescheiden door de plantenwortels. Veel van die bacteriën zijn goedaardig en beschermen de plant tegen ziekteverwekkers. Eén van de manieren waarop deze goedaardige bacteriën de plant kunnen beschermen is via het aanschakelen van een immuneresponse die door de hele plant werkt, dus ook systemisch in bovengrondse delen van de plant. Deze vorm geactiveerde resistentie wordt ook wel "Induced systemic resistance" (ISR) genoemd. Wereldwijd wordt aan dit fenomeen veel onderzoek gedaan. Hieronder staan resultaten uit een recent gepubliceerd artikel waarin de rol van de transcriptiefactor MYB72 in ISR wordt beschreven.

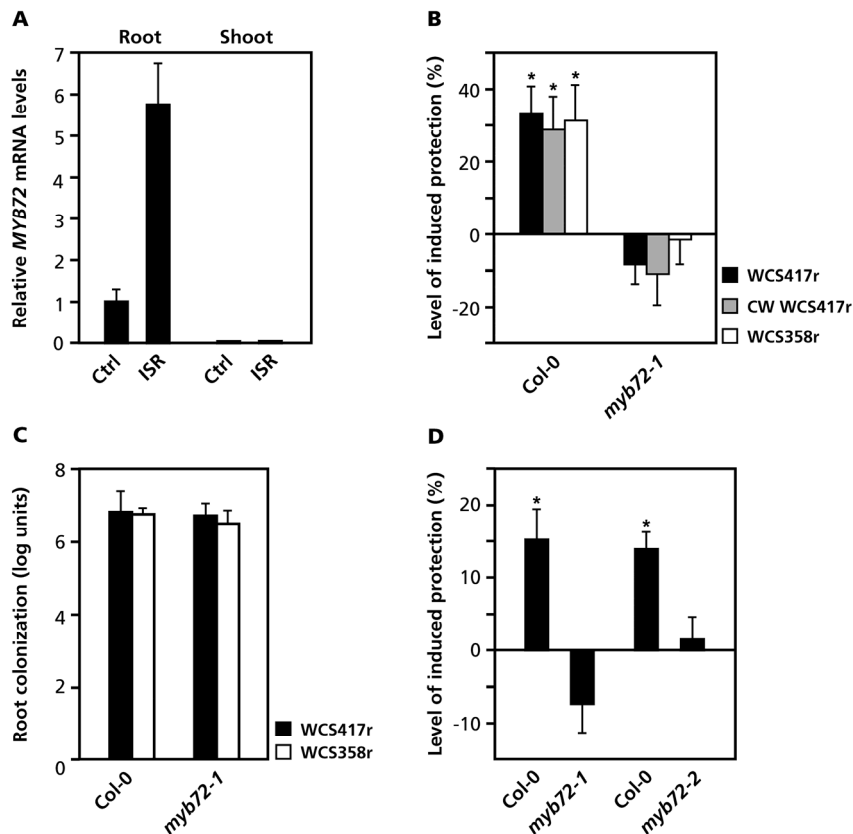


Figure 3. ISR against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) is blocked in *myb72* knockout mutants.

(A) Q-RT-PCR analysis of *MYB72* transcript levels in roots and shoots of Arabidopsis Col-0 plants that were grown in soil for 2 weeks with or without ISR-inducing *Pseudomonas fluorescens* WCS417r bacteria.

(B) Levels of induced protection against *Pst* DC3000 in Col-0 and knockout mutant *myb72-1*. ISR was induced by growing the plants for 3 weeks in soil containing living ISR-inducing WCS417r or *Pseudomonas putida* WCS358r bacteria, or crude cell wall material of WCS417r (CW WCS417r). Five-week-old plants were challenge inoculated with virulent *Pst* DC3000. Four days after challenge inoculation, the percentage of diseased leaves was assessed and the level of induced protection calculated on the basis of the reduction in disease symptoms relative to challenged, non-induced plants. The absolute proportions of diseased leaves in the control treatment was 53.9 (Col-0) and 50.7% (*myb72-1*). Asterisks indicate statistically significant differences compared to non-induced control plants (Students t-test, $\alpha=0.05$; $n=20$).

(C) Numbers of rifampicin-resistant WCS417r or WCS358r bacteria (log₁₀ of the number of colony forming units (cfu)/g) in the rhizosphere of the plants at the end of the bioassay. In the rhizosphere of non-induced plants, no rifampicin-resistant bacteria were detected (detection limit 103 cfu/g root fresh weight (FW)).

(D) Quantification of WCS417r-induced protection against *Pst* DC3000 in wild-type Col-0 and knockout mutants *myb72-1* and *myb72-2*. The level of induced protection was calculated as described above (B). The absolute proportions of diseased leaves in the control treatments was 78.0 (Col-0), 73.4% (*myb72-1*), 79.1 (Col-0), and 74.1% (*myb72-2*). Asterisks indicate statistically significant differences compared to non-induced control plants (Students t-test, $\alpha=0.05$; $n=20$).

All bioassays were repeated with similar results. Error bars represent standard errors.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009

Vervolg vraag 3

3a. Welke conclusies kun je uit de resultaten zoals gepresenteerd in Figuur 3 trekken? Geef één hoofdconclusie per deelfiguur (A, B,C en D) en motiveer daarbij je antwoord.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009

Vervolg vraag 3:

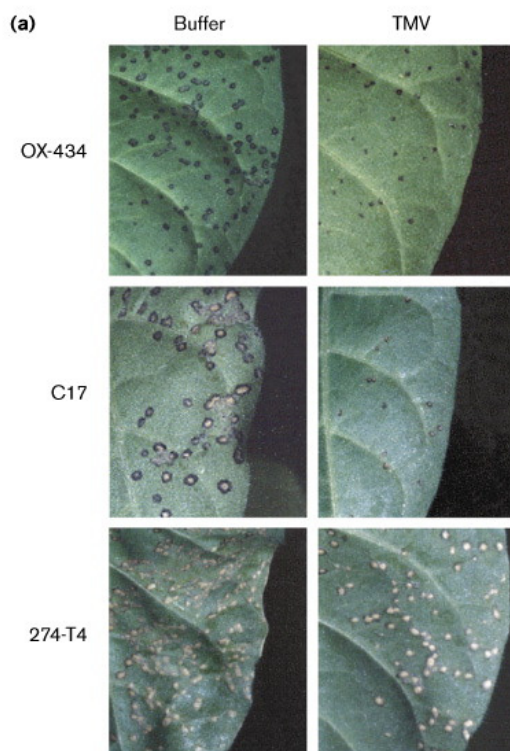
3b. In Figuur 3D wordt gebruik gemaakt van twee mutanten: *myb72-1* en *myb72-2*. Waarom zullen de onderzoekers twee verschillende mutanten hebben gebruikt?

3c. Het *MYB72* gen codeert voor een transcriptiefactor eiwit. Beredeneer welke rol deze transcriptiefactor in de signaaltransductieroute van ISR speelt.

3d. De in de bovenstaande studie beschreven goedaardige *Pseudomonas fluorescens* bacteriën kunnen niet alleen ziekte onderdrukken in planten, het is ook bekend dat sommige stammen van deze bacteriesoort de "droge mollenziekte" in champignons kan onderdrukken. Droge mollen worden veroorzaakt door infectie van de champignon met de schimmel *Verticillium fungicola*. Beredeneer op welk mechanisme deze biologische manier van ziekteonderdrukking gebaseerd kan zijn en beschrijf een experiment om daar bewijs voor aan te leveren.

Vraag 4

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is een belangrijk sleutelenzym in de regulatie van een breed scala aan afweermechanismen in planten. Na infectie door een pathogeen wordt het *PAL* gen geactiveerd waarna er vele secundaire plantenstoffen worden geproduceerd via de phenylpropanoid pathway. In veel plantensoorten is PAL ook belangrijk voor de biosynthese van salicylzuur (SA). In de onderstaande figuur staan de resultaten uit een artikel van Felton et al. in *Current Biology*. In dit artikel is het effect van PAL op resistentie tegen pathogenen en insecten is onderzocht. Hierbij hebben de onderzoekers gebruik gemaakt van transgene tabaksplanten die het PAL gen tot overexpressie brachten (OX-434), transgene planten die het PAL gen sterk verminderd meer tot expressie kunnen brengen (275-T4), en controle planten (C17).



(b)

Line	Mean lesion diameter (mm)	
	Buffer	TMV
OX-434	1.90 ± 0.38	0.48 ± 0.28
C17	2.23 ± 0.32	0.99 ± 0.28
274-T4	2.00 ± 0.31	1.79 ± 0.29

Current Biology

Figure 4.

(c) Lesions caused by Tobacco Mosaic Virus (TMV) on systemic leaves of control (C17), PAL-suppressed (274-T4), or PAL-overexpressing (OX-434) tobacco plants. Three days before the challenge inoculation with TMV, a lower leaf had been pre-inoculated with either buffer (control solution) or TMV. The symptoms shown in figure 4a are caused by the secondary challenge inoculation by TMV.

(d) Lesion sizes for the treatments described in (a). Each value represents the mean ± standard deviation of 30 lesions or more on three independent plants.

4a. Welke conclusies kun je trekken uit de gegevens zoals gepresenteerd in figuur 4a en 4b? Betrek hierbij zowel effecten van PAL op basis resistentie tegen TMV en systemisch geïnduceerde resistentie tegen TMV en motiveer je antwoord.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009

Antwoord vraag 4a:

Vervolg vraag 4:

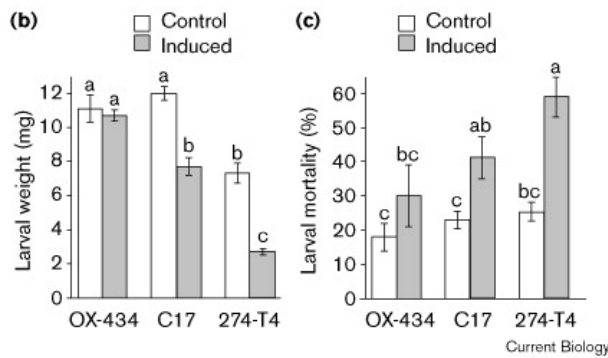
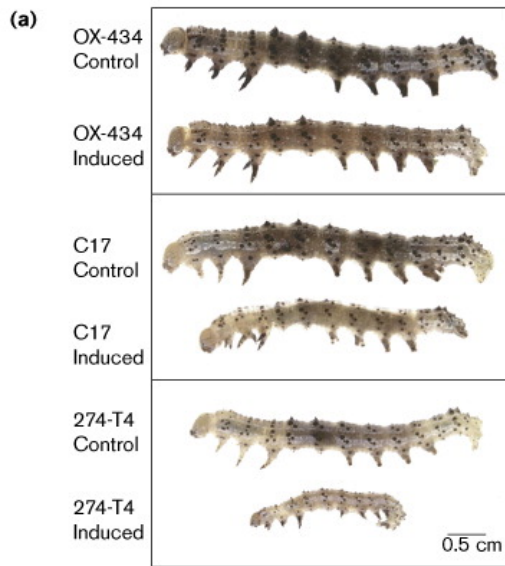


Figure 5. Insect resistance of systemic leaves of PAL-overexpressed (274-T4) or control (C17) tobacco plants that had been pre-induced with water on a lower leaf (control) or by grazing with caterpillar larvae (induced).

(a) Typical size and appearance of larvae 5 days after feeding on systemic leaves

(b) Larval weight and (c) larval mortality after 5 days of feeding on systemic leaves.

(b,c). The mean \pm standard error (SE) of four independent experiments is shown. Values for columns with different letters are statistically significantly different at $P < 0.05$.

4b. Welke conclusies kun je trekken uit de gegevens zoals gepresenteerd in figuur 5? Motiveer je antwoord.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009

Vervolg vraag 4:

4c. Uit figuren 4 en 5 valt op te maken dat PAL een tegengesteld effect heeft op het niveau van resistentie tegen TMV en het insect. Geef hiervoor een verklaring.

4d. Uit figuur 4 valt op te maken dat na infectie door TMV de wild-type tabaksplant systemisch resistenter wordt tegen een volgende aanval door TMV. Uit figuur 5 valt op te maken dat insectenvraat de wild-type tabaksplant resistenter maakt tegen een volgende aanval door het insect. Stel je infecteert eerst een wild-type tabaksplant met TMV en je zet er een paar dagen later de larven van het insect op. Wat voor effect verwacht je dan op het niveau van resistentie tegen het insect? Verklaar je antwoord. En kun je op basis van de gegevens uit figuur 4 en 5 ook een uitspraak doen over het effect van insectenvraat op het niveau van resistentie tegen TMV? Motiveer je antwoord.

Naam:
Studentnummer:

Eindtoets PAA 09-04-2009