



# Hvede forsværer sig aktivt mod sygdommen gråplet

Nye undersøgelser viser, at resistente hvedeplanter aktiverer en kaskade af forsvarsreaktioner, når de går til modangreb på svampen *Septoria tritici*, der er årsag til gråplet. Disse forskningsresultater kan være et skridt på vejen mod at finde effektive metoder til varig forebyggelse af alvorlige plantesygdomme.

Af Hans Jørgen Lyngs Jørgensen, Inga C. Bach, Jens Due Jensen, Bertram H. Larsen, David B. Collinge & Nandini P. Shetty, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Svampesygdommen gråplet er gennem de sidste årtier blevet et betydeligt større problem i hvedeavlens herhjemme såvel som i udlandet. I Danmark anses denne sygdom nu som en af de faktorer, som giver størst udbyttetab i hvededyrkingen. Desuden bliver kvaliteten af kernerne dårligere. Svampen snylter på planten, så der bliver mindre næring til kernerne, som bliver mindre end normalt.

Gråplet skyldes angreb af svampen *Septoria tritici*.

(Figur 1). Denne svamp har været kendt i mere end 150 år, og man kender dens infektionscyklus, men den kemiske dialog mellem svampen og dens vært er ikke forstået i detaljer. Den stigende betydning af *Septoria tritici* som sygdomsfremkaldende (**patogen**) svamp vækker bekymring, og på verdensplan er der nu store bestræbelser i gang for at opklare årsagerne til, at den angriber hvedemarkerne i højere grad end tidligere.



**Figur 1. Angreb af gråplet i vinterhvede**

Til venstre ses symptomer i mark, tidligt forår. Svampens frugtleger (pyknider) ses som små sorte prikker på de visne blade. Til højre ses symptomer sidst i vækstsæsonen på de øvre blade. Store dele af bladvævet er dødt (nekrotisk). Foto: Hans Jørgen Lyngs Jørgensen.





### Skadevirkning og bekæmpelse

Det anslås, at det årlige tab i Danmark alene udgør 400 mill. kr. De skader, som skyldes svampeangreb kan begrænses, hvis afgrøden behandles med **fungicider (svampemidler)**, som slår sygdommen ned, men målet er at begrænse brugen af fungicider mest muligt. Dels kan der være miljømæssige problemer ved at bruge dem, dels er det ikke sikkert, at effekten af et fungicid varer ved. Fungicider mister nemlig ofte deres evne til at bekæmpe en sygdom, ikke fordi fungicidet ændrer sig, men fordi svampen tilpasser sig og bliver i stand til at tolerere midlet.

### Svampens biologi og livscyklus

Svampen *Septoria tritici*, som er årsag til sygdommen gråplet, blev beskrevet første gang i 1842. I mere end 100 år kendte man kun til den del af svampens livscyklus, hvor den formerer sig ukønnet, men i 1970'erne fandt man ud af, at en svamp ved navn *Mycosphaerella graminicola*, som blev beskrevet i 1870, er den kønnede form for *Septoria tritici*. *Septoria tritici* og *Mycosphaerella graminicola* er altså

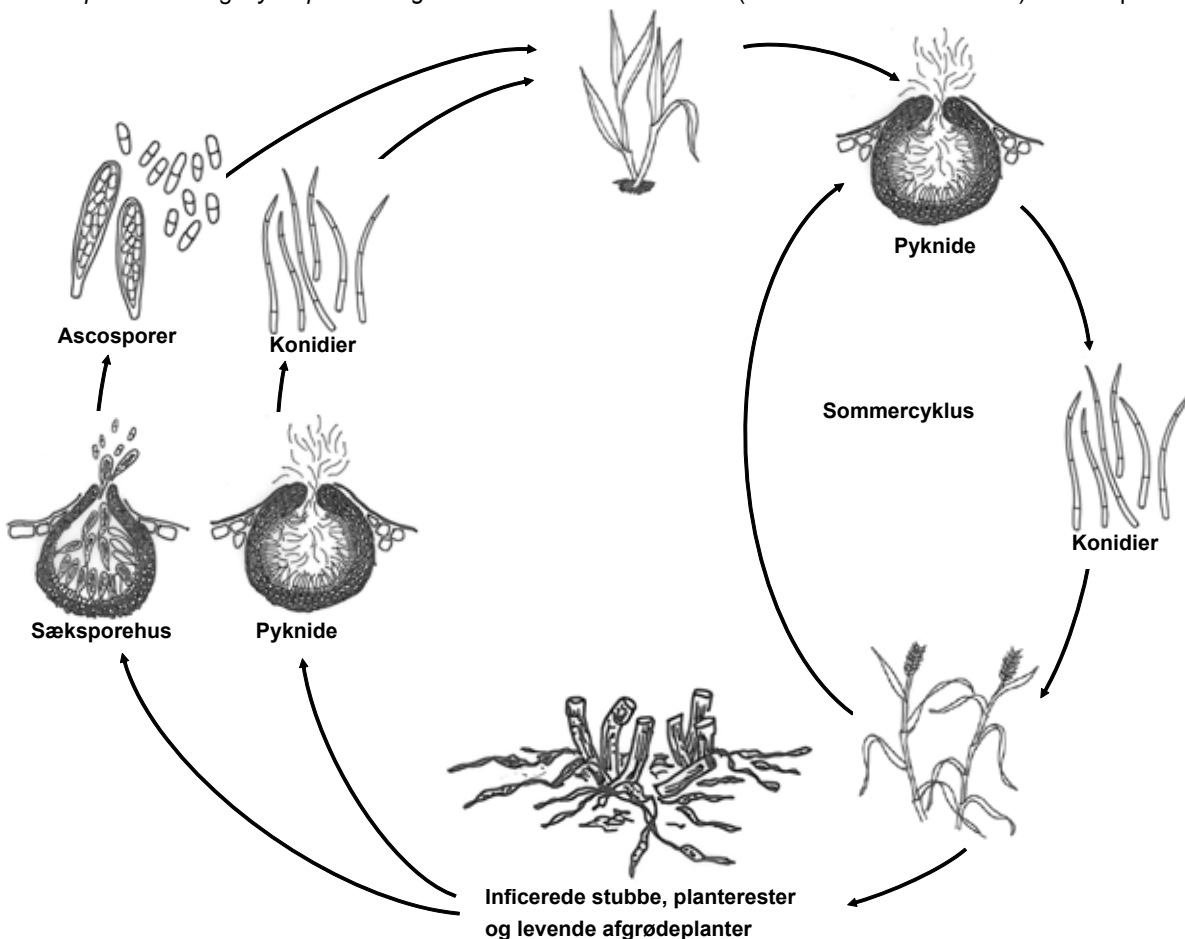
den samme organisme, og begge navne bruges. Under klimaforhold som i Danmark forekommer både ukønnet og kønnet forering. Den kønnede forering forudsætter, at **hyfer** fra to forskellige **parringstyper** af svampen mødes.

### Epidemi eller tilpasning

Under danske forhold har svampens ukønnede forering størst betydning for udvikling af sygdommen gråplet i hvedemarkerne, fordi der kan dannes mange generationer af **sporer** fra tidligt forår og i løbet af sommeren. Den kønnede forering sker derimod sent i sæsonen, når der ikke er meget friskt plantemateriale tilbage at inficere. Derfor spiller den kønnede forering ikke nogen stor rolle for epidemisk udbredelse af svampen. Dens vigtigste rolle er at skabe individer med nye **genotyper** som vil kunne tilpasse sig nye forhold i marken (Figur 2).

### Infektion

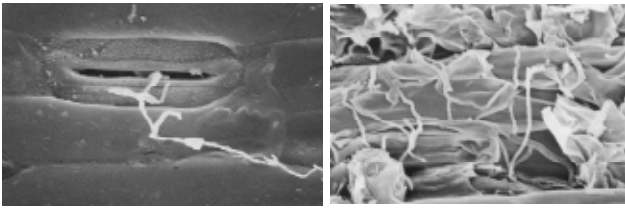
Infektionen af en hvedeplante indledes med, at svampens sporer (kønnede eller ukønnede) lander på et blad og



Figur 2. Livscyklus

**Pyknider**, hvorfra de ukønnede sporer (konidier) spredes, og **perithecier (sæksporehuse)**, hvorfra de kønnede sporer (ascosporer) frigives, kan findes fra efteråret på spildkorn, planterester og nye afgrødeplanter. I foråret kan begge typer **frugtlegemer** producere sporer. I Danmark er det især pyknider, der producerer sporer i foråret. Er vejret fugtigt og lunt, kan der produceres mange sporer i vækstsæsonen (sommercyklus), og man får en epidemi. Under danske forhold dannes ascosporer sidst på sæsonen og spiller derfor ikke så stor en rolle for epidemisk udvikling af sygdommen. Derimod er de kønnede ascosporer vigtige, for at svampen kan skabe nye genotyper. Tegninger: Nini Leroul.





**Figur 3. Scanning elektronmikroskopi af inficeret bladvæv.**

Til venstre ses bladoverflade ca. 3 dage efter inokulering. En svampehyfe er ved at vokse ned igennem en spalteåbning. Til højre ses undersiden af overhudsceller med spalteåbninger ca 11 dage efter inokulering. Svampen har koloniseret hulrummet under spalteåbningen, men er stadig i sin biotrofe fase. Foto: Nandini P. Shetty og Hans Jørgen Lyngs Jørgensen.

spirer. Svampens hyfer trænger dernæst ned gennem plantens **spalteåbninger** (Figur 3). *Septoria tritici* er en såkaldt **hemibiotrof** svamp. Det betyder, at den først har en såkaldt **biotrof** fase, hvor svampehyferne vokser i hulrummene mellem plantens celler (**apoplasten**). Denne periode omtales som sygdommens **latenstid**. Efter denne indledende fase kommer en **nekrotrof** fase, hvor svampen slår plantens celler ihjel og lever af dem.

Det antages, at svampen i den indledende fase lever som en **biotrof** organisme, der snylter på plantens celler, men da der ingen synlige symptomer er på planten i denne del af svampens livscyklus, kan det ikke udelukkes, at svampen lever som en **endofyt**, der opholder sig i plantevævet uden at gøre skade. Under alle omstændigheder optager svampen sukkerstoffer mv., der findes naturligt og frit tilgængeligt i apoplasten.

#### *Svampen går til angreb*

Pludselig ændrer svampen karakter og går til angreb på plantens celler. Når svampen indleder sin nekrotrofe fase, dør de angrebne planteceller i løbet af ganske kort tid (1-2 dage). Bladvævet bliver brunt og visner. Samtidig sker der en kraftig stigning i mængden af svampens hyfer i bladene, og svampen påbegynder den del af sin livscyklus, hvor den formerer sig ukønnet. Den danner en særlig type **frugtlegermer (pyknider)** under spalteåbningerne i det visne bladvæv, og herfra udsendes millioner af sporer (konidier), som kan inficere nye planter. Konidierne spredes primært via vanddråber.

Længden af den biotrofe fase afhænger til en vis grad af hvedesortens modtagelighed, men det er især miljøforhold som temperatur og fugtighed, der er afgørende for, hvor lang tid der går, før svampen skifter karakter.

#### Våbenkapløb mellem plante og patogen

Resistente afgrøder anses generelt for at være den mest miljøskånsomme måde til at begrænse skadevirkningerne af sygdomme og insektangreb mv. Undersøgelser af nedarvning af resistens mod gråplet har taget fart i løbet af de sidste 10-15 år.

For nogle former for resistens mod svampe er der involveret mange gener, som hver især har lille effekt, men for resistens mod gråplet er det ofte enkeltgener, der er afgørende for, om en plante er resistent eller ej (Boks 1). Indtil nu er der rapporteret om 13 forskellige enkeltgener, som giver resistens mod gråplet i hvede,

#### Boks 1. Resistens og virulens: gen-for-gen hypotesen

En hypotese om det genetiske samspil mellem en planteart (vært) og en patogen organisme (parasit) blev fremsat og efterprøvet i 1942-1956 af den amerikanske plantepatolog Harold Henry Flor. På det tidspunkt havde man vidst i årtier, at planters resistens mod sygdomme skyldes gener, der nedarves som beskrevet af Mendel i 1800-tallet, men Flor var den første, der studerede nedarvning af angrebsevne (virulens) hos en patogen svamp. På baggrund af omfattende studier af nedarvning af resistens og virulens hos hhv. hørplanter og rustsvampen *Melampsora lini* konkluderede Flor, at både udvikling af sygdom hos en plante og en plantes evne til at modstå angreb, blev kontrolleret af par af matchende gener hos hhv. plante og patogen. I følge Flors såkaldte gen-for-gen hypotese kan en plante således indeholde et dominant resistensgen (R) eller et recessivt gen (r) for modtagelighed, mens patogenet kan indeholde et dominant avirulens gen (Avr) eller et recessivt virulensgen (vir). Kun i de tilfælde, hvor planten har R-genet og patogenet har Avr-genet, kan planten modstå svampens angreb. I de øvrige tre kombinationer (R + vir, r + Avr og r + vir) udvikles der sygdom. Flere efterfølgende forskere antog, at der sker en direkte interaktion eller genkendelse mellem de proteiner, som hhv. et R-gen i planten og et Avr-gen i patogenet koder for, men i de tilfælde, hvor detaljerne kendes, har det vist sig, at samspillet mellem plante og patogen er mere kompliceret.

Flors gen-for-gen hypotese beskriver kun såkaldt enkeltgen- eller specifik resistens, hvor et enkelt gen i planten ofte har en meget kraftig og stærkt hæmmende effekt på en specifik genotype af et patogen. Resistens kan også skyldes mange plantegener, der samarbejder (kaldes uspecifik resistens). Her har hvert gen kun en meget beskeden effekt, men samlet kan de have en stærk virkning. Når man ønsker at udvikle en afgrødesort med resistens, er det meget nemmere at arbejde med enkeltgen-resistens end med resistens, der skyldes mange gener. Når forskellige genotyper og sorter af en afgrøde testes for resistens, smittes planterne som regel med velkarakteriserede isolater af svampen.

Effekten af enkeltgen-resistens er som regel rigtig god, når en ny sort introduceres, men ofte tabes effekten efter få år. Det skyldes, at patogen-populationen ændrer sig. Som følge af genetisk rekombination i forbindelse med kønnet formering samt mutationer findes der som regel mange genetisk forskellige individer (genotyper) af en patogen svampeart ude i marken. Når man har et R-gen i afgrøden, der hæmmer bestemte genotyper stærkt eller fuldstændigt, vil disse avirulente genotyper ikke kunne formere sig i den pågældende mark. Individer med virulent genotype i forhold til afgrødesorten, vil derimod ikke hæmmes og kan stadig angribe afgrødeplanterne med fuld kraft. I næste svampegeneration vil de virulente genotyper blive favoriseret og talstærkt opformeret på bekostning af de avirulente genotyper af svampen, som er følsomme overfor planternes forsvar. Resultatet er, at svampepopulation i løbet af få generationer eller år hovedsageligt vil bestå af virulente genotyper, som kan angribe afgrødesorter med det pågældende R-gen. Denne ændring, hvor svampepopulationen over tid tilpasser sig til at kunne angribe sorter med specifik resistens kaldes populært "nedbrydning" af resistensen, men beror altså på en ændring af svampepopulationene, ikke af R-gener i planten. Patogener har som regel sværere ved at "nedbryde" resistens, som skyldes flere gener, som samarbejder om at styre en forsvarsreaktion.





men der findes sandsynligvis flere. Resistensgenerne er opkaldt efter det engelske navn for sygdommen (*Septoria tritici* blotch) og betegnes *Stb 1-12* og *Stb 15*. Selvom en hvedeplante indeholder et af disse resistensgener, er den ikke nødvendigvis resistent overfor alle **genotyper** af *Septoria tritici*. De svampegener, som er afgørende for om *Septoria tritici* kan inficere en hvedeplante eller ej, betegnes hhv. **virulens** og **avirulensgener** (Boks 1). Hverken for resistensgenerne i planten eller virulens/avirulens-generne i svampen kendes DNA-sekvensen i sin helhed, og man kender også kun lidt til genprodukterne.

#### Bevarelse af resistensgeners effekt

Resistensgenerne bruges til at udvikle nye sorter, som er beskyttet mod svampeangreb. Desværre "nedbrydes" resistens, som kun skyldes et enkelt gen ofte i løbet af få år (Boks 1). Det skyldes ikke, at resistensgenet forsvinder, eller at planterne holder op med at producere svampehæmmende stoffer. Derimod opformerer nye typer af svampen, som er mindre følsomme overfor de svampehæmmende stoffer, der dannes via plantens resistensgener. En anden strategi for patogene svampe er, at de ændrer sig, så de ikke bliver genkendt af plantens **receptorer**. Det betyder så, at planten ikke går i gang hurtigt nok med at producere de svampehæmmende stoffer, hvorved svampen får mulighed for at inficere.

### Forsvarsmekanismer

Planter har mange sideløbende forsvarsmekanismer. Nogle af dem går i gang tidligt og andre senere i infektionsprocessen. Nogle er generelle og virker overfor mange forskellige patogener. Andre er specifikt rettet mod bestemte genotyper af en svampeart.

For at identificere de forskellige lag i hvedeplanters forsvar mod *Septoria tritici* har vi undersøgt den kemiske dialog mellem et **isolat** af svampen og to sorter af hvede.

#### Studier af resistent og modtagelig sort

I vores studier af, hvordan resistensen kommer til udtryk mod gråplettsvampen, er hovedvægten på sorterne Stakado og Sevin, som er h.h.v. fuldt resistent og fuldt modtagelig overfor det hollandske isolat IPO323 af svampen. I Sevin ses total bladdød således 13-15 dage efter, at planterne er

blevet smittet, mens der slet ikke ses symptomer i Stakado, selv efter 3 uger (Figur 4). Stakado indeholder bl.a. resistensgenet *Stb 6* og sandsynligvis endnu et specifikt unavgivet resistensgen samt noget uspecifikt resistens.

#### Reaktive iltformer signalerer fare

En af de første forsvarsreaktioner, efter at en hvedeplante er blevet udsat for smitte, er ophobning af **reaktive iltformer (ROS)**, primært brintoverilte ( $H_2O_2$ ). ROS er direkte giftige i større mængder, men samtidig spiller de en rolle som signalstoffer i planten til aktivering af andre forsvarsreaktioner. Ophobet  $H_2O_2$  i plantevæv kan detekteres vha. DAB-farvning (Boks 2).

I den resistente hvedesort Stakado ophobes  $H_2O_2$  især under svampens biotrofe fase, mens der ses meget lidt i den modtagelige sort Sevin (Figur 5). Denne tidlige ophobning af  $H_2O_2$  sker især omkring plantens spalteåbninger, hvor svampen trænger ind. I modsætning hertil ses der en meget stor ophobning af  $H_2O_2$  i Sevin under den nekrotrofe fase, hvor vævet fuldstændig fyldes med  $H_2O_2$ . Denne sene ophobning i Sevin er dog ikke relateret til forsvar, men derimod en stressreaktion, da vævet dør og ødelægges.

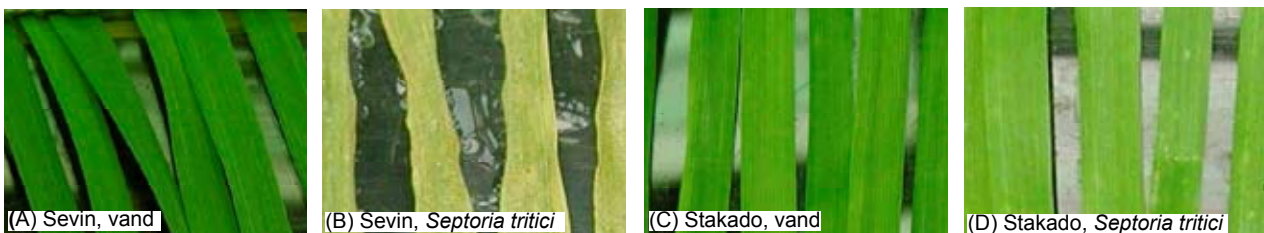
Man kan studere, hvilken rolle  $H_2O_2$  spiller for hvedens resistens ved at sprøjte en fortyndet opløsning af stoffet ind i plantens blade og studere udviklingen af svampen (Figur 6). Infiltrationsforsøg med  $H_2O_2$  viser, at  $H_2O_2$  forsinket infektion (Figur 7).

#### Callose - en forsvarsmur

Samtidig med den tidlige ophobning af  $H_2O_2$  afsættes også stoffet **callose**, på det sted i cellen, hvor svampen er ved at trænge ind (Figur 8). Det sker i større omfang i Stakado end i Sevin. Callosedannelsen medvirker til at forsegle plantens cellevægge, hvilket tjener to formål. Dels forhindres det, at svampen får næringsstoffer og vand fra plantens celler, og dels forhindres angrebsstoffer (enzymmer og toksiner), som frigives fra svampen, i at beskadige plantens celler.

#### Toksiner

Nogle patogene svampe, f.eks. arter af *Fusarium*, producerer toksiner, der er giftige for både planter og dyr. *Septoria tritici* producerer ikke toksiner, som er giftige for dem, der spiser kornet, men det kunne tyde på, at *Septoria*

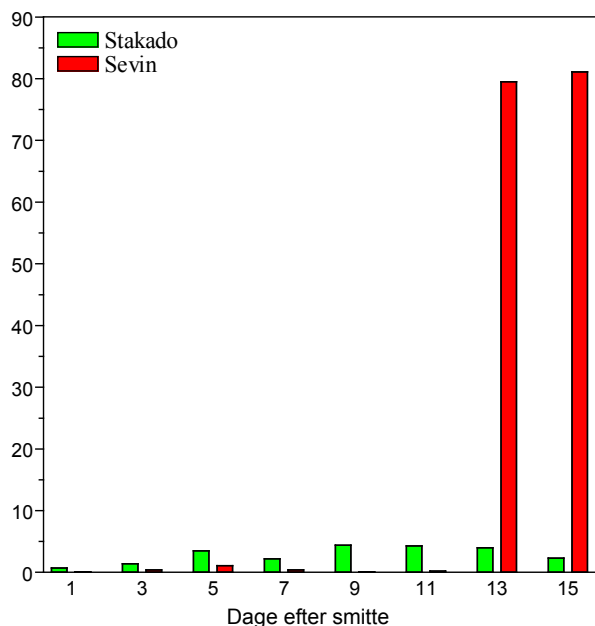


**Figur 4: Interaktion mellem hvede og *Septoria tritici*.**

Den modtagelige hvedesort Sevin og den resistente sort Stakado blev smittet med ukønnede svampesporer fra isolatet IPO323 af *Septoria tritici* under kontrollerede betingelser. For hvert smittet forsøg indgik nogle kontrolplanter, som blev sprøjtet med rent vand. På billederne ses symptomudvikling 15 dage efter smitte. (A) Sevin behandlet med vand, (B) Sevin smittet med *Septoria tritici* (bemærk de små sorte prikker, som er pyknoter), (C) Stakado behandlet med vand, (D) Stakado smittet med *Septoria tritici*. Foto: Nandini P. Shetty.



Bladceller med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%)



**Figur 5. Udvikling af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i bladvæv**

Udvikling i antallet af bladceller (%), som ophobede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, blev observeret over 15 dage, efter at den resistente sort Stakado og den modtagelige sort Sevin blev smittet med *Septoria tritici*.

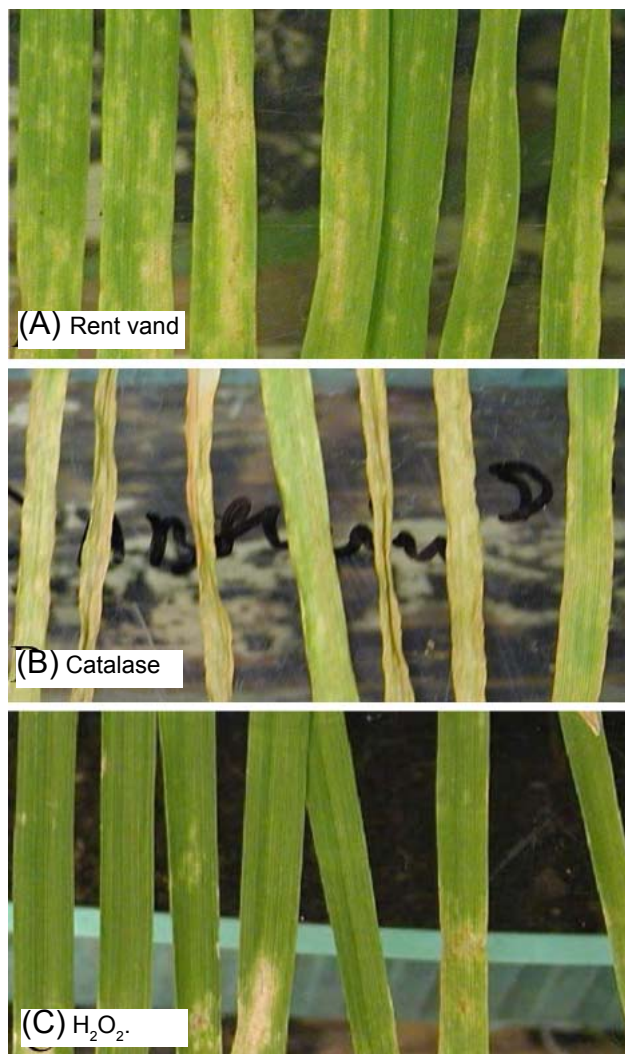
*tritici* danner toksiner, som er skadelige for planten. Hidtil er der ikke fundet sådanne toksiner i inficeret plantevæv, men vi har for nyligt konstateret, at *Septoria tritici* udskiller flere forskellige toksiner, når svampen dyrkes i flydende kultur (Figur 9).

Et af disse toksiner er et protein, som har en masse på ca. 14 kDa. Dette toksin forårsager vævsdød, hvis man sprøjter det ind i modtagelige hvedesorter, og vi har påvist at denne vævsdød hænger sammen med ophobning af



**Figur 6. Infiltrering af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Med en sprøjte uden kanyl kan man forsigtigt presse en opløsning ind i levende blade. Sprøjten sættes på bladoverfladen og en finger holdes bagved som støtte. Så sprøjtes væsken ind og den fordeler sig jævnt i hulrummene i bladet. Med lidt øvelse kan man sprøjte væske ind uden at skade bladene. Foto: Bertram H. Larsen.



**Figur 7. Analyse af funktion af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i blade**

På de tre billeder ses symptomer af *Septoria tritici* i den modtagelige sort Sevin 13 dage efter smitte. I (A) er der i bladene indsprøjtet rent vand. I (B) er indsprøjtet en opløsning af enzymet catalase (2000 Units/ml), hvis eneste kendte funktion er at nedbryde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til vand og ilt. I (C) er der indsprøjtet en tynd opløsning (4 mM) af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I alle bladene er der indsprøjtet væske 3 gange, nemlig lige før planterne blev smittet med *Septoria tritici*, samt 3 og 5 dage efter smitte. De indsprøjtede væsker påvirkede svampens udvikling forskelligt. Således ses i (A) begyndende symptomer og svampen dannede pyknider 15 dage efter smitte. I (B) er planterne helt døde og pyknider sås allerede efter 11 dage, og i (C) er der ingen symptomer at se 13 efter dage, men først efter 21 dage, hvor svampen dannede pyknider. Samlet viser dette, at tilførsel af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> virker hæmmende på svampen, mens fjernelse af H<sub>2</sub>O fremmer svampens vækst. De hvide pletter på bladene i C skyldes skade som følge af indsprøjtning. Foto: Nandini P. Shetty.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viden om sådanne toksiner er vigtig for at forstå, hvorfor sygdommen gråplet udvikles som den gør.

#### *β*-1,3-glucanase nedbryder svampens cellevægge

Et andet vigtigt forsvarsredskab, planten har, er at danne stoffer, der direkte sigter på at nedbryde svampen. Blandt disse stoffer findes enzymet β-1,3-glucanase, som nedbryder stoffet β-glucan, der udgør en vigtig del af



**Figur 8. Callosedannelse**

Stakado 7 dage efter infektion. Bladet er observeret med fluorescenslys i mikroskop efter klaring som beskrevet i boks 2. Callosedannelse ses som lysende pletter. Foto: Nandini P. Shetty.

svampens cellevæg. I Stakado ses en ophobning af  $\beta$ -1,3-glucanase i den biotrofe fase og især i apoplasten, hvor svampen gror, mens dette ikke sker i Sevin. En høj  $\beta$ -1,3-glucanase-aktivitet i apoplasten kan svække svampen meget hurtigt, efter den er trængt ind i bladet. Desuden vil nedbrydningsprodukter fra svampen kunne tjene som signalstoffer (såkaldte **PAMPs** eller **MAMPs**), der er med til at udløse yderligere forsvarsreaktioner. Vi isolerede  $\beta$ -1,3-glucan fra *Septoria tritici* og behandlede planter af Sevin med en meget lav koncentration. Det resulterede i, at planterne blev fuldstændigt beskyttet mod angreb af svampen, og samtidigt kom der øget ophobning af  $H_2O_2$ , callose og  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### Forstærkning af plantens cellevægge

Hvis man ser nærmere på  $\beta$ -1,3-glucanase enzymet viser det sig, at aktiviteten skyldes flere forskellige former eller typer af enzymet. Således vil nogle af  $\beta$ -1,3-glucanase-typerne være med til at nedbryde svampens cellevægge, mens andre typer er involveret i forstærkning af plantens cellevægge ligesom callose.

I tilgift til disse forstærkninger af cellevæggen ophobes forskellige **glycoproteiner** i apoplasten. Et af disse stoffer er **extensin**, som er et **hydroxyproline-rigt glycoprotein**. Glycoproteinerne er højst sandsynligt frigivet fra plantens cellevægge, og der er foreslået to forskellige funktioner for extensin og lignende stoffer. Den ene funktion er, at de kan styrke plantens cellevæg ved at lave krydsbindinger, som kan virke som forankring for andre molekyler, der fysisk blokerer patogeners indtrængning. Krydsbinding af extensin kræver desuden ophobning af ROS, hvilket også ses i hvede, som er smittet med *Septoria tritici*. Den anden funktion er mere direkte. I forsøg med andre plantearter og patogener, har det vist sig, at extensin direkte kan ophobes omkring bakterier i apoplasten og derved forhindre bakteriernes videre vækst. Da *Septoria tritici* lever i apoplasten og vi observerede extensin her, kunne det tyde på, at extensin spiller samme rolle i hvede.

## Fra forskning til anvendelse

I vores forskning har vi fokuseret på en enkelt resistent hvedesort, Stakado. Vores studier viser, at samspillet mellem værtplante og patogen er komplekst, og at plantens forsvar omfatter så forskellige reaktioner som produktion af reaktive iltforbindelser og callose samt ændringer af både svampens og plantens cellevægge.

Det er stadig ikke klart, hvad der får svampen til at skifte karakter fra uskadelig endofyt til aggressivt patogen. Både enzymer og toksiner kan tænkes at være involveret i den hurtige ændring fra biotrof til nekrotrof vækst, men endnu er det ikke klart præcist, hvilken rolle disse stoffer spiller for, at svampen kan fuldføre sin livscyklus.

#### Toksiner - reduceret følsomhed?

Vi har påvist at *Septoria tritici* under nogle forhold kan danne toksiner, som kan skade plantens celler. Hvis man finder ud af, hvordan toksinerne virker i værten og forårsager vævsskade, kan man muligvis udvikle nye sorter, der er mindre følsomme og dermed reducere udbyttetabet som følge af infektion.

#### $\beta$ -1,3-glucan - et alternativ til fungicider?

Vores grundlæggende undersøgelser af hvilke molekyler, der er involveret i hvedeplanters forsvar mod svampen *Septoria tritici* har bl.a. vist, at  $\beta$ -1,3-glucan fra svampens cellevæg virker som signalstof, der udløser en lang række forsvarsreaktioner i planten. I øjeblikket er vi i gang med at studere  $\beta$ -1,3-glucans evne til at beskytte hvede mod angreb af *Septoria tritici*. Bl.a. testes forskellige oprensninger af  $\beta$ -1,3-glucan for at se, om det rene stof er bedre til at beskytte end en grovoprensning. Disse undersøgelser efterfølges af detaljerede undersøgelser af, hvilke forsvarsprocesser der aktiveres i planten, og hvordan plantens fysiologi påvirkes ved behandling. Der er en mulighed for at kunne bruge  $\beta$ -1,3-glucan som plantebeskyttelsesmiddel i praktisk hvededyrkning, men en forudsætning for det er, at man ved, hvordan planten påvirkes ved behandling.



**Figur 9. Dyrkning af *Septoria tritici*.**

Her ses isolat IPO323 efter 21 dages vækst på et flydende dyrkningsmedium (Fries-medium). Foto: Nandini P. Shetty.





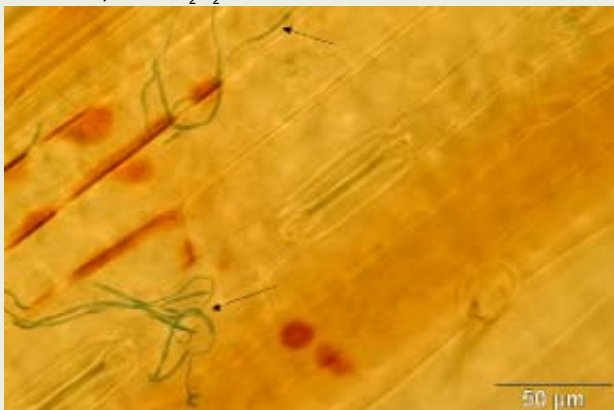
## Boks 2. Farvning af blade med DAB og detektion af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Stoffet DAB (3,3'-diaminobenzidine) vil reagere med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, når det optages i et blad, og enzymet peroxidase er til stede, hvilket det stort set altid er. Når DAB reagerer med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vil det polymerisere til et rødbrunt stof, der let kan ses i mikroskop.

Man kan selv studere om H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ophobes i blade. Vi har set på hvedeblade, som var blevet kunstigt smittet med *Septoria tritici*, men man kan sagtens se på andre blade, som er friske (levende), ikke er for store, og som f. eks. er naturligt smittet med en svamp. For blade af græsser og kornarter skæres bladet over lige inden det bruges. Andre blade, f.eks. fra træer, plukkes og nedsættes i DAB-opløsningen.

**Farvning af blade med DAB. NB! Stoffet DAB er giftigt, så alle processer skal foregå i stinkskab, og handsker skal benyttes.**

- Til 10 ml DAB opløsning opløses 0,01 g DAB i af-ioniseret, sterilt vand. Tilsæt det meste af vandet til et bægerglas med en magnet i. Tilsæt DAB og start omrøring med magnetomrøreren.
- Efter omrøring i minimum 30 minutter måles pH i opløsningen med en pH-elektrode. Det er nødvendigt sænke pH til 3,6 for at få DAB til at opløses fuldstændigt. Der tilsættes nogle få dråber 0,1 N HCl ad gangen til pH er 3,6. pH stiger langsomt igen i takt med at DAB opløses. Når alt DAB er opløst, skal pH være ca. 3,8.
- Når alt DAB er opløst tilsættes resten af vandet op til 10 ml. Opløsningen skal nu være farveløs, evt. ganske let rødlig. Hvis opløsningen er stærkt rødbrun kort efter fremstilling må den kasseres.
- Når blade skal farves, skæres friske blade af og placeres med det same i DAB-opløsningen. For hvedeblade bruges 1 ml DAB-opløsning i f.eks. et Eppendorfrør, og bladene inkuberes i opløsningen i 8 timer. Inkuberingstiden og mængden af DAB-opløsning kan tilpasses til andre typer blade. DAB-opløsningen kan også sprøjtes ind i bladene, og her kan en effekt observeres hurtigere.
- Efter perioden i DAB-opløsningen skal bladene klares og kan derefter observeres i mikroskop. Som kontrol på, at farvningen har virket, ses på bladenes ledningsstreng. Disse skal være rødbrune, da der er meget H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidase i dette væv. Desuden vil man være i stand til at se farvning andre steder, hvis der er ophobet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

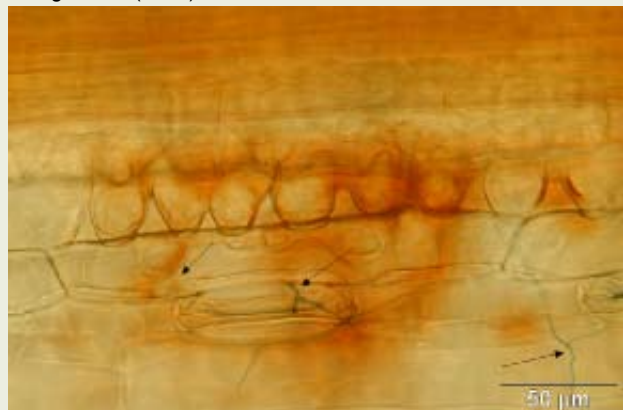


**Klaring af blade for observation af blad anatomi eller svampeinfektion. NB! Alle processer skal udføres i et stinkskab.**

- Placer 3-4 lag papirservietter (f.eks. Kleenex) i en plastikæske med tætsluttende låg. Papiret mættes med en blanding af 100 % ethanol og iseddike (3:1 (v/v)). Tilsæt så meget af blandingen, så papiret bliver fuldstændigt mættet, men ikke så meget, så de blade, som man vil klare, bliver oversvømmet.
- Bladstykker eller hele blade (hvis det er små blade) skæres ud og lægges forsigtigt på de våde servietter. Låget lukkes og æsken efterlades til næste dag. Klorofyllet i bladene vil nu gradvist blive trukket ud af bladene og ned i papiret. Samtidigt vil molekylerne i bladet blive fikseret, så bladene kan holde sig meget længe. Bladene vil ofte vride sig og vil derfor ikke røre papiret fuldstændigt. Det kan afhjælpes ved at sætte objektglas ned lodret til at presse bladene ned. Servietterne skiftes dagligt, indtil al klorofyl er ude af bladene. Pas på at fikseringsmidlet ikke fordampes, da bladene så ødelægges.
- Når al klorofyl er ude af bladene, lægges de på servietter, som er vædet med afioniseret vand i minimum 1 time og maximum 12 timer for at gøre dem smidige og mindre skrøbelige.
- Efter vandbehandlingen overføres bladene til nye servietter, som er mættet med en lactoglycerol-opløsning. Her kan bladene opbevares i adskillige måneder, så længe servietterne ikke tørrer ud.
- Nu kan bladene observeres i lysmikroskop efter montering i lactoglycerol. Her kan det være en fordel at farve strukturer på overfladen af bladene med et farvestof, f.eks. med Evans Blå.

### Materialer:

- DAB kan købes hos firmaet Sigma (3,3'-diaminobenzidine, D-8001). DAB-farve skal fremstilles lige før brug. DAB-opløsningen kan kun opbevares nogle timer i køleskab.
- Til ethanol/iseddike (3:1 (v/v)) er det vigtigt at bruge 100 % ethanol (absolut ethanol).
- Til lactoglycerol-opløsningen blandes af-ioniseret vand, mælkesyre og glycerol i forholdet 1 : 1 : 1 (v/v).
- Evans Blå fremstilles ved at tilsætte 0,25 g farve til 100 ml lactoglycerol og blande grundigt.
- Papirservietter, en plastikæske med tætsluttende låg, magnetomrører, magnet, bægerglas, pH-meter og HCL.
- Reference: Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y. & Collinge, D.B. (1997). The Plant Journal. 11: 1187-1194.



Mikroskopi af DAB-farvede og klarede bladstykker af hvedesorten Stakado, som er resistent overfor *Septoria tritici*. Prøven til venstre er udtaget 1 dag efter smitte med *Septoria tritici*. Der er fokus på overfladen af bladet. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ophobning ses som rødbrun farvning i de alleryderste lag af bladet. Pilene viser svampens trådformede sporer, som er farvet blå af Evans Blå. Prøven til højre er udtaget 7 dage efter smitte med *Septoria tritici*. Der er fokus nede i bladet. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ophobning ses som rødbrun farvning i hulrummet rundt om den spaltesåbning, hvor svampen er trængt ind. Pilene viser svampens trådformede hyfer i vævet. Kun hyfer på overfladen af bladet er farvet blå. Selvom Stakado er resistent kan nogle af svampens hyfer godt trænge et stykke ind i bladet, men væksten stopper, bl.a. som følge af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ophobning. I Sevin ses kun lidt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ophobning (se Figur 5), og derfor kan svampen brede sig og gå ind i den nekrotrofe fase.





### Kombination af flere resistensmekanismer

Mange af de hvedesorter, som dyrkes i Europa har resistensgenet *Stb6*, som vi har studeret i sorten Stakado. Vi har nu god indsigt i resistensmekanismerne i Stakado, men vi ved ikke, hvad de enkelte resistensgener i sorten koder for. Ligeledes mangler vi viden om, hvad de andre resistensgener mod *Septoria tritici* koder for.

For at gøre det vanskeligere for patogenet at tilpasse sig og dermed forsinke "nedbrydning" af resistens, kan det være en fordel at indsætte mere end ét resistensgen i nye sorter. Flere af de 13 kendte resistensgener mod *Septoria tritici* anvendes derfor af forædlerne, men selvom der er tale om forskellige og uafhængigt nedarvede resistensgener, ved man ikke, om de udløser de samme forsvarsreaktioner i planten. Det kan bevirke, at man ikke opnår en ligeså optimal og langsigtet beskyttelse mod gråplet, som hvis man havde indsat gener med forskellig effekt.

Kun med indgående kendskab til, hvordan resistens virker mod patogener, og hvilke stoffer planten laver for at forsvare sig, kan man kombinere forskellige resistensmekanismer i nye sorter og dermed sikre bedst mulig bevarelse af effekten af de resistensgener, som er dannet som følge af årtusinders evolution.

### Referencer

- Jørgensen, H.J.L.; Smedegaard-Petersen, V. (1999). Host-pathogen interactions in the *Septoria*-disease complex. Pages 131-160 (ch. 9) in: *Septoria on Cereals: A Study of pathosystems*. Eds. J.A. Lucas, P. Bowyer & H.M. Anderson. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Shetty, N.P. (2002). Defence Responses in Wheat after Inoculation with *Septoria tritici*. PhD.-thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Department of Plant Biology, Denmark.
- Shetty, N.P.; Jensen, J.D.; Knudsen, A.; Finnie, C.; Geshe, N.; Blennow, A.; Collinge, D.B. & Jørgensen, H.J.L. (2009). Effects of  $\beta$ -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60: 4287-4300.
- Shetty, N.P.; Jørgensen, H.J.L.; Jensen, J.D.; Collinge, D.B. & Shetty, H.S. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 121: 267-280.
- Shetty, N.P.; Kristensen, B.K.; Newman, M.-A.; Møller, K.; Gregersen, P.L. and Jørgensen, H.J.L. (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 333-346.
- Shetty, N.P.; Mehrabi, R.; Lütken, H.; Haldrup, A.; Kema, G.H.J., Collinge, D.B. and Jørgensen, H.J.L. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*. 174: 637-647.

### Boks 3. Relaterede forskningsprojekter

På internationalt plan er der intens forskning i både *Septoria tritici* og i hvede, som er svampens vigtigste vært-plante, men der er kun meget begrænset forskning i svampens infektionsbiologi og dens påvirkning af hvedeplanterne under infektionen. Ved Det Biomedicinske Fakultet har vi gennem de senere år studeret gråpletsvampens samspil med sin vært. Forskningsresultaterne, som er beskrevet i denne artikel er produkter af et forskningsprojekt og arbejde, som er udført af ph.d.-, speciale- og bachelorstuderende ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi. Arbejdet fortsættes.

- **Understanding the role of ROS in defence and pathogenesis in the wheat-*Septoria tritici* interaction. How does the pathogen manipulate the host for successful infection?** Forskningsprojekt støttet af Statens Jordbrugs- og Veterinærvidenskabelige Forskningsråd (Nu Forskningsrådet for Teknologi og Produktion) i perioden 2005-2009. Bevillingshaver Nandini P. Shetty. Projektdeltagere Jens Due Jensen, Maria A. Petersen, Bertram H. Larsen, Anna Haldrup, David B. Collinge og Hans J. Lyngs Jørgensen (kontaktperson).
- **Defence responses in wheat after inoculation with *Septoria tritici*.** PhD-projekt udført af Nandini Prasad Shetty. Projektet blev afsluttet i 2002.
- **$\beta$ -1,3-glucanases indflydelse på hvedens forsvar mod *Septoria tritici*.** Bachelorprojekt udført af Jens Due Jensen og Kristian Skytte. Projektet blev afsluttet i 2004.
- **Sources and roles of Active Oxygen Species in wheat infected with *Septoria tritici*.** Specialeprojekt udført af Jens Due Jensen. Projektet blev afsluttet i 2007.
- **Regulation of antioxidants during oxidative stress in wheat after inoculation with the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici*.** Specialeprojekt udført af Maria Agnete Petersen. Projektet blev afsluttet i 2009.
- **Ability of  $\beta$ -1,3-glucan to elicit defence responses in wheat.** Igangværende specialeprojekt, som udføres af Bertram H. Larsen.





## Ordforklaringer

**Apoplast:** Rummet udenfor planters cellemembraner, hvor vand og opløste stoffer transporteres gennem et væv eller et organ. Apoplasten omfatter både det frie rum mellem cellerne såvel som cellevægge og de vandledende elementer i ledningsvævet.

**Biotrof:** En organisme, som lever af andre levende organismer. (bio = liv, trofos = den, som ernærer) En organisme, som er i en biotrof fase, lever udelukkende af andre organismers levende celler.

**Callose:** Plantepolysaccharid, som består af glucoseenheder, der er bundet sammen ved  $\beta$ -1,3-bindinger. Den kemiske betegnelse for callose er  $\beta$ -1,3-glucan. Det dannes i cellevægge vha. enzymet callose synthase og nedbrydes af  $\beta$ -1,3-glucanaser.

**Endofyt:** En organisme, som lever i levende plantevæv (endo = indenfor, phyton = plante). En organisme, som er i en endofytiske fase, lever imellem en plantes celler uden at forårsage symptomer.

**Extensiner:** Extensiner er en familie af hydroxyproline-rige glycoproteiner (HRGPs), som findes i plantecellevægge. Extensinerne forekommer i store mængder og danner netværk af krydsbindinger i unge cellevægge. De er således vigtige for opbygning af cellevægge, bl.a. under vækst af cellerne.

**Frugtlegerne:** Strukturer hos svampe, hvor der produceres sporer til enten kønnet eller ukønnet forering. Hos *Septoria tritici* findes to slags frugtlegerne: pyknider, hvor der dannes ukønnede sporer (konidier) via mitose og perithecier (sæksporehus), hvor der dannes kønnede sporer (ascosporer) via meiose.

**Fungicid:** Kemiske forbindelser, der benyttes til at bekæmpe svampesygdomme i bl.a. planter. Kommer fra latin: fungus = "svamp" og endelsen "-cid" = "dræbende".

**Genotype:** Anlægspræg. Det sæt egenskaber, som ligger forudbestemt i arveanlæggene for en celle/organisme eller et individ. Arveanlæggene kan være dominante eller recessive. Det udtryk, som de nedarvede gener har, kaldes fænotypen (fremtoningspræget).

**Glycoprotein:** Proteiner som indeholder oligosaccharidkæder (kulhydrater, glycaner), der er kovalent bundet til polypeptid (protein) sidegrene.

**Hemibiotrof:** Organismer, der har både en biotrof og en nekrotrof levevis, som er adskilt i tid.

**HRGP (hydroxyprolin-rige glycoproteiner):** Hvis der i proteindelen af et glycoprotein indgår aminosyren (2S,4R)-4-hydroxyprolin (eller L-hydroxyprolin ( $C_5H_9O_3N$ )), taler man om HRGP. Extensiner udgør en af flere familier af HRGP.

**Hyfe (flertal hyfer):** Lange, ofte forgrenede og trådformede strukturer, der udgør en svamps ukønnede legeme. Hyfer kan bestå af mange eller kun en enkelt celle og vokser fra spidsen. Mange hyfer samlet kaldes et mycelium.

**Isolat:** Opformeret klon af et enkelt individ fra en population.

**Konidie (flertal konidier):** Ukønnet svampesporer.

**Latenstid:** Den periode, der forløber fra en plante er smittet med et patogen, og til der fremkommer synlige symptomer.

**Læbeceller:** Specialiserede, aflange celler, der sidder rundt om en spalteåbning og styrer åbning og lukning af spalteåbningerne.

**Nekrotrof:** En organisme, som lever af dødt organisk materiale (nekros = lig, trofos = den, som ernærer). En organisme, som er i en nekrotrof fase, dræber andre organismers celler og lever af disse døde celler.

**PAMP/MAMP:** Eng. Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) eller Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs), beskriver molekyler eller molekylestrukturer, som udgør en vigtig del af forskellige patogener, og som genkendes af plantens forsvar (the innate immune system: celler og mekanismer om forsvarer værten mod infektion på en specifik måde). Disse molekyler udgør små molekulære motiver, som er meget velbevarede indenfor bestemte klasser af mikrober, og som genkendes af forskellige receptorer i både planter og dyr. Genkendelse af strukturer hos patogenet gør planten i stand til at reagere med forsvarsreaktioner på uundværlige, men simple molekylstrukturer, som er udbredt i mange patogener. Da molekylerne er vigtige for patogenet, er det meget svært for disse at ændre dem. Derfor er forsvarssystemer, som udnytter PAMPs og MAMPs robust og ikke let at omgå.

**Parringstype:** Betegnelse for "køn" i højere organismer (eukaryoter), som har kønnet forering med kønsceller (gameter) med samme udseende. Da gameterne ser ens ud, omtales de ofte som numre, bogstaver eller blot "+" og "-" i stedet for "mandlige" og "kvindelige" typer. Befrugtning kan kun finde sted mellem forskellige parringstyper.

**Patogen:** en sygdomsfremkaldende organisme, specielt virus, bakterier, svampe eller andre mikroorganismer.

**Perithecium (flertal perithecier):** Da. sæksporehus: ofte flaskiformet frugtlegerne som indeholder de kønnede sporer (ascosporer) i sporesække (asci).

**Pyknide (flertal pyknider):** Ukønnet frugtlegerne produceret af bestemte typer svampe i svampeordenen Sphaeropsidales (Deuteromycota, Coelomycetes). Pyknider er ofte runde eller omvendt pæreformede, og på indersiden dannes de ukønnede sporer, som kaldes konidier eller pyknidiosporer. Når pykniden modner, frigives sporerne gennem en åbning i toppen. Hos *Septoria tritici* findes pykniderne under spalteåbningerne, og konidier frigives i en klar til hvidlig sporeslim.

**Reaktive iltformer/Reactive Oxygen Species (ROS):** Frie radikaler som indeholder et iltatom. De er meget små molekyler, som er meget kemisk reaktive pga. tilstedeværelsen af en uparret elektron. ROS dannes som et naturligt biprodukt af plantens normale ilt-stofskifte og spiller en vigtig rolle som signalmolekyle. Forskelligt stress på planten (e.g. UV-lys, varme eller patogenangreb) kan medføre, at ROS-niveauet stiger dramatisk, hvilket kan skade plantens celler. ROS under patogenangreb kan spille en rolle i plantens forsvar. ROS kan fungere som signalmolekyle, men kan også være direkte giftigt overfor patogenet. Nekrotrofe patogener kan have fordele af ROS under infektionen, idet plantens væv skades af ROS.

**Receptor:** Proteinmolekyle, enten i cellemembranen eller i cytoplasma i en celle, hvor et signalmolekyle kan fasthæftes. Et molekyle, der bindes til en receptor, kaldes en ligand og kan f.eks. være et protein, et hormon eller et toxin. Når liganden bindes, undergår receptoren en ændring, som igangsætter et respons i planten (nogle ligander blokerer dog blot receptoren uden at udløse et respons).

**Spalteåbning(er) (Stoma(ta)):** Åbning(er), som findes i overhuden på blade, stængler m.v. og som regulerer udveksling af luftarter ( $CO_2$  og  $O_2$ ) med omverdenen. En spalteåbning omgives af to læbeceller, der styrer åbningen.

**Sporer:** For svampe en struktur, der tjener til og er tilpasset til spredning og overlevelse af svampen. De er mikroskopiske, kan have mange former og farver, kan være enkelt- eller fler-cellede og være dannede ved ukønnede (mitose) eller kønnede (meiose) processer. Ukønnede sporer kaldes ofte konidier.

