

Meldugsvampens fascinerende biologi

– et plagsomt patogen

Af Hans Thordal-Christensen



Meldugkolonier på rose.

Mange vil kende meldugsvampen som en generende skadevolder i deres haver. Især kendes dens hvide filtignende kolonier, meldug, på rosernes blade. Men mange andre planter angribes også af meldugsvampen. Har man øjnene åbne, vil man opdage, at en anseelig procentdel af planterne i vore omgivelser kan være angrebet af denne let genkendelige svamp. I virkeligheden er det forkert at tale om én meldugsvamp. Der er faktisk tale om mange forskellige arter og underarter, og ofte er det sådan, at der er specificitet mellem slægter af værtsplanten og en meldug-underart. Det vil sige,

at forskellige planter kun angribes af deres egen meldugsvamp.

Meldug har så meget succes og held med at invadere vidt omkring, ikke mindst fordi dens livscyklus er kort, og dens opformeringsrate er høj i hver generation. Fra en spore lander på et blad, til den har udviklet en koloni, der producerer nye sporer til spredning, går der kun ca. en uge. Men efterfølgende vil kolonien vokse yderligere og producere tusindvis af sporer. En anden vigtig faktor er, at den kan spredes med vinden over lange afstande. For en del år siden påviste kolleger, at levedygtige sporer kan spredes over Nordsøen.

Hans Thordal-Christensen (f.1958) Agonom 1983, Ph.d. 1987, Post.doc. forløb på University of California og Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole. Gæsteforsker ved Stanford University 1997-98. Programleder på RISØ fra år 2000. Programleder på Inst. f. Jordbrugsvidenskab, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole fra 2005.

VILLUM KANN RASSMUSSEN FONDEN bevilligede 4,4 mio. kroner i 2002 til Forskningscenter RISØ, Afd. for Planteforskning, som forskningsgruppen på daværende tidspunkt var tilknyttet. Beløbet blev givet til avancerede proteomstudier af meldugsvampens samspil med værtsplanten.

I landbruget belaster meldugangreb især dyrkningen af byg og hvede. Den samlede danske produktion af disse to kornarter er ca. 9 mio. tons om året ifølge Danmarks Statistik, og værdien heraf er ca. 6-7 mia. kr. Meldug forårsager let, at flere procent af denne produktion går tabt.

Bekæmpelse af meldug

Meldug bekæmpes på to måder. Der kan anvendes svampedræbende kemikalier, såkaldte fungicider. Men det er både dyrt og problematisk for mennesker og miljø. Derfor er den foretrukne metode at bruge resistens, som imidlertid også indebærer en række vanskeligheder. Den klassiske måde at etablere resistente sorter på er lang og omstændelig, for man

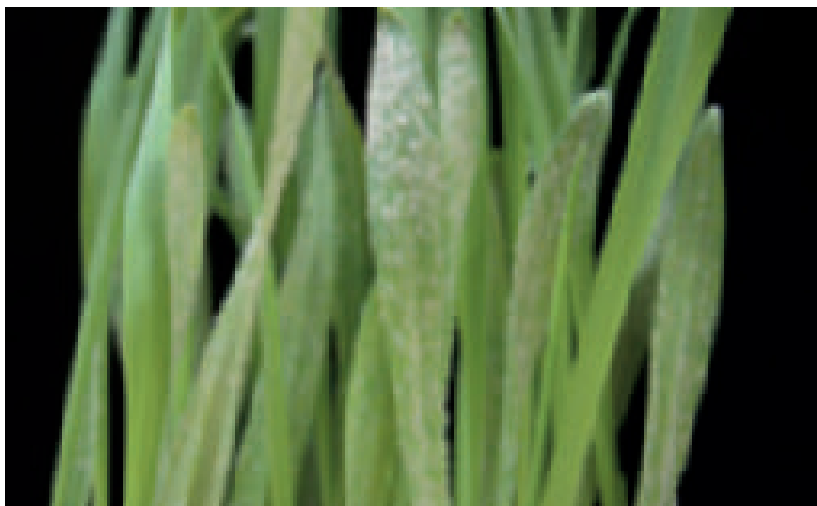
bliver nødt til at gå tilbage til gencenterne for den pågældende planteart.

Et gencenter er det geografiske område, hvor arten har sin oprindelse. For byg og hvede er det først og fremmest i lande som Tyrkiet, Iran, Syrien, Irak og Israel. Gennem tiderne er der foretaget mange indsamlinger af plantelinier, som er hjemtaget og testet for deres resistens mod eksempelvis meldug. En gang imellem opdages der en interessant linie, hvor efterfølgende undersøgelser ofte viser, at linien har en resistens, der er baseret på et enkelt gen. Netop det forhold at resistensen er baseret på et gen, gør det let for planteforædlerne at overføre resistensen til det genetiske materiale, som de på det pågældende tidspunkt fæster lid til kan danne basis for fremtidens foretrukne sorter.

Resistens-genet

Vejen til resistens-genet er lang. Forædlerne krydser indledningsvis den resistente linie med deres egen favorit linie. Afkommet heraf har som bekendt halvdelen af sine gener fra hver af de to forældre. Da forædlerne typisk kun er interesseret i det ene gen, som giver resistensen, og ønsker at slippe for de øvrige mange tusinde gener, må de gennemføre et tilbagekrydsningsprogram, der indebærer at krydsningen må gentages 5-6 gange efter hinanden. Den proces kan tage fra 2 til 5 år afhængigt af situationen.

Efter alt det besvær og yderligere nogle år med videre udvælgelse og en statslig godkendelsesproces, skal genet stå sin egentlige prøve i landmændenes marker. Det er desværre almindeligt, at genet kun fungerer godt i 2 til 3 år, hvorefter det taber sin evne til at beskytte kornet. Der opstår nemlig nye meldugracer, som



Meldugkolonier på byg.

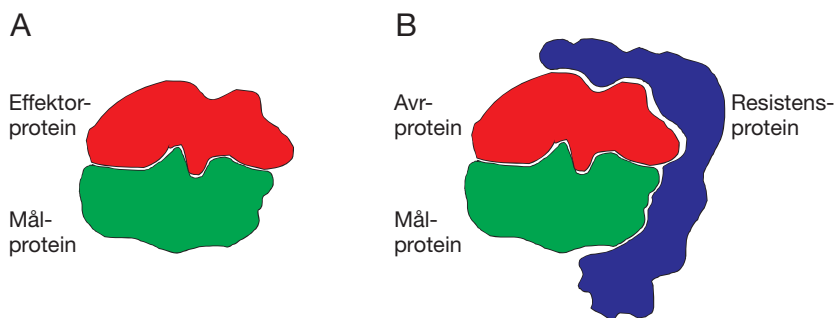
er ganske upåvirkede af resistensen i planten.

Vi er efterhånden ved at have en rimelig forståelse af biologien i hele dette forløb. Kort fortalt koder resistensgenet fra Mellemøsten for et protein i planten, der overvåger, om der kommer effektorproteiner fra meldugsvampen ind i plantens celler. Fra andre plantepatogen systemer ved vi, at det, som R(esistens)-proteinet kan detektere, er bindinger mellem effektorproteinerne og deres målproteiner i planten. I meldug plantesystemerne kender vi ikke målproteinerne og kun nogle få af effektorproteinerne, og vi kan kun gætte på det præcise formål med bindinger mellem dem. Vi ved dog, at melduggener muteres, når nye meldugracer opstår, som resistensen ikke virker på. Vi taler om, at melduggen bliver virulent (aggressiv), hvor den tidligere var avirulent (ikke-aggressiv). Dvs. at effektorgenerne, der muteres, også kaldes av(irulens) gener. Der findes eksempler på meldugracer, som har mistet 6-7 effektor/avr-gener, og vi forstår ikke helt, hvorfor det har så ringe betydning for svampen.

Meldugsvampe kan ligesom f.eks. rustsvampe kun vokse på levende plantevæv. Det er altså i svampens interesse at undgå at dræbe plantevævet. Svampene løser dette problem ved, at svampens hyfer vokser på overfladen af f.eks. et blad. Herfra gennemtrænger tynde hyfer først bladets ydre cellevæg for derefter at vokse ind i enkelte celler i bladets øverste celledag, epidermis. Inden i epidermiscellen dannes nu en meget specialiseret svampestruktur, kaldet haustoriet. Det udmærker sig ved at kunne optage næringsstoffer fra værten uden at dræbe plantecellen. Der er på den måde tale om et symbiotisk samspil mellem de to organismer. Normalt forstås symbiose som noget, der er til gensidig gavn for de to organismer, men selvom denne form for symbiose kun gavner den ene organisme, har den en del træk til fælles med de gensidigt gavnlige symbioser mellem planter og mikroorganismer.

.....omics

Vores forskningsgruppe interesserer sig for samspillet mellem bygplanten og meldugsvampen, og vi fokuserer



Skitse af hvordan vi forestiller os effektor/avr-, mål- og resistens-protein spiller sammen. I A fungerer proteinet fra svampen som effektor på et ukendt målprotein. Det samspil menes at medvirke til at haustoriet fungerer, og sygdom udvikles. I B fungerer proteinet fra svampen som avirulens-protein, fordi planten har et resistensgen, der koder for resistensproteinet. Denne genkendelse udløser en effektivt forsvarsmekanisme i planten, så sygdom ikke udvikles.

bl.a. på symbiosen, fordi det er her de interessante sammenhænge mellem resistens, effektorgener og haustoriets funktion forekommer.

Vi baserer vores arbejde på de to teknologier ”transkriptomics” og ”proteomics”, som sammen med andre -omics vinder større og større indpas i biologisk forskning i disse år.

Mens molekylærbiologer tidligere kun kunne håndtere enkelte eller få gener og proteiner ad gangen, så muliggør de forskellige -omics, at vi nu kan arbejde med mange og i nogle tilfælde alle gener og proteiner på én gang. Generelt er formålet med disse teknologier at tilvejebringe store datamængder, som senere kan studeres og fortolkes. Ved at arbejde med sådanne data kan der gøres nye opdagelser og findes nye sammenhænge, uden at man i første omgang behøver at foretage egentlige laboratorieforsøg. På engelsk kaldes det data-mining.

Teknologierne har deres udgangspunkt i genomerne. Et genom er den samlede DNA-mængde, der findes i en organisme, og én af de vigtigste og største udfordringer i genomics er at sekventere hele denne DNA-

mængde fra den art, man arbejder med. Herved får man samtidig sekventeret alle generne, og man har herefter et fantastisk udgangspunkt for fremtidigt arbejde med arten. Genomerne for mange mikroorganismer og enkelte højerestående arter er sekventerede, bl.a. menneske, mus og ris. Vi ved nu, at svampe typisk har omkring 10.000 gener, mens de højerestående arter har omkring 30.000 gener.

Hvad er så de andre -omics, transkriptomics og proteomics? Et transkript er et RNA molekyle, som er en afskrift fra et gen, og det er samtidig et mellemlid mellem genet og det protein, det koder for. Den øjeblikkelige mængde af et transkript er et udtryk for genaktiviteten. Så i transkriptomics måler man mange eller alle transkripter tilsammen på given tid og sted. I modsætning til genomet, er transkriptomet variabelt.

Parallelt med transkriptomics taler vi om proteomics. Det er en teknologi, hvor mange eller alle proteiner måles samtidig. Det er næppe overraskende, at disse -omicsteknologier er vanskelige og ressourcerkrævende.

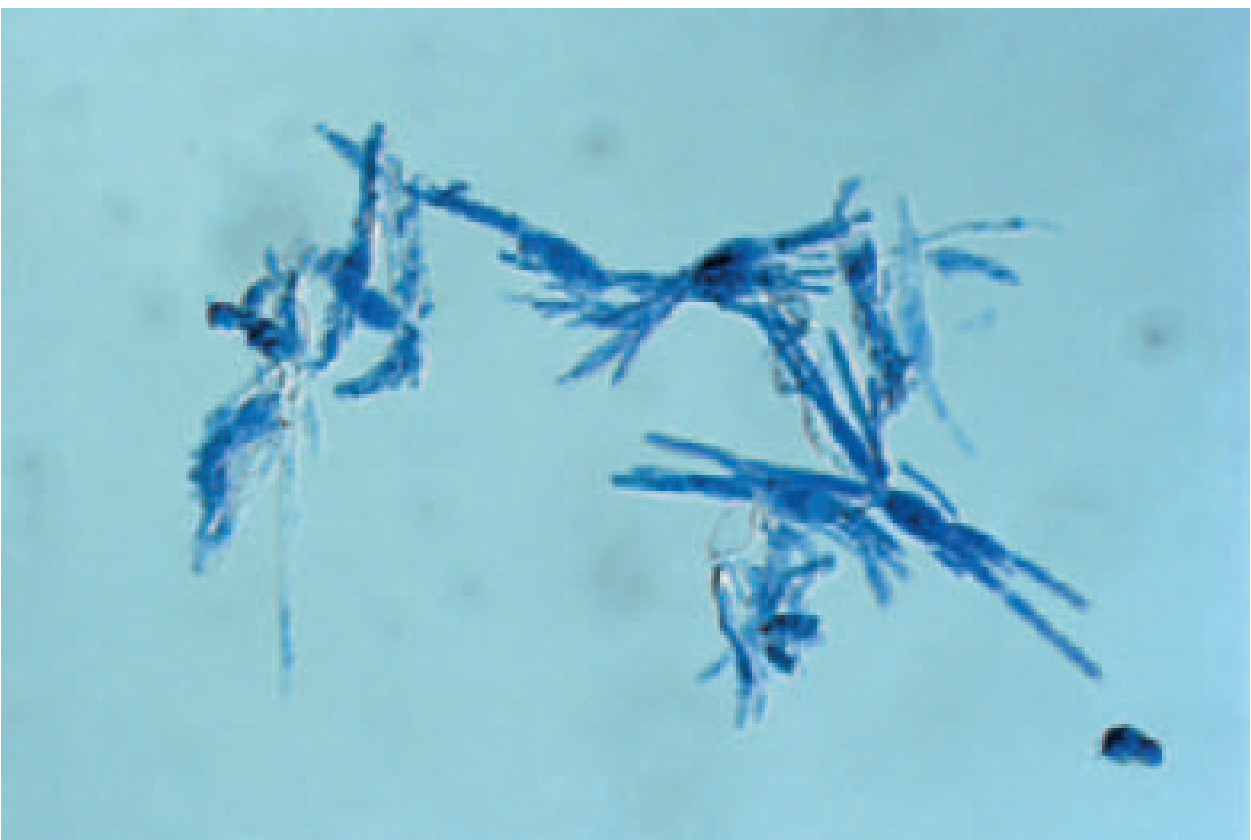
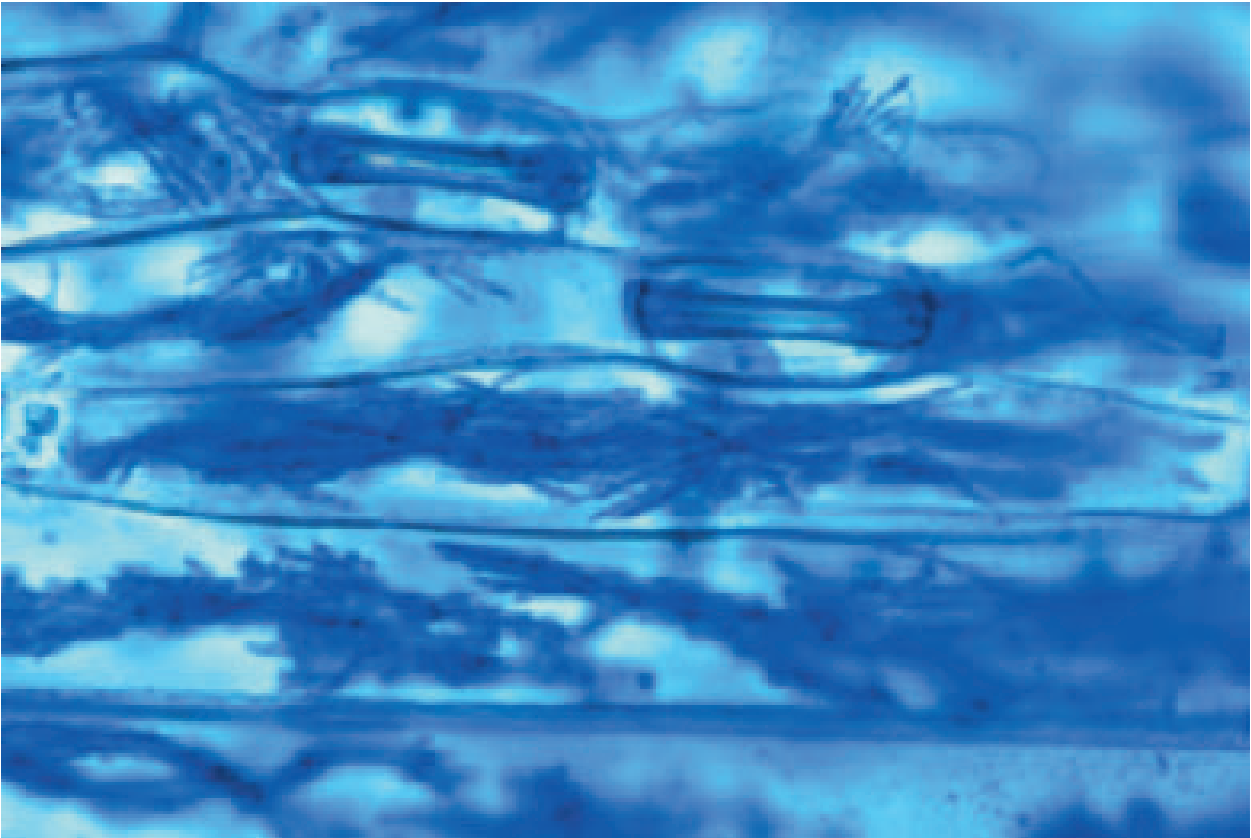
Et haustorie opstår

For at svampen kan leve, må den trække næringsstoffer ud af planten, og det sker med haustoriet, der fungerer som en slags brobygger mellem de to organismer, planten og svampen. Haustoriet trænger ind i plantens celle og integreres meget intimt med plantecellen og stimulerer planten til at danne en membran omkring sig, vel at mærke uden at planten dræbes. På fascinerende vis bliver haustoriet en integreret del af cellen. Biologisk sker der nu det, at svampen sender de før omtalte effektorproteiner over i plantecellen, og de påvirker så planten til først at acceptere haustoriet og derefter fodre det.

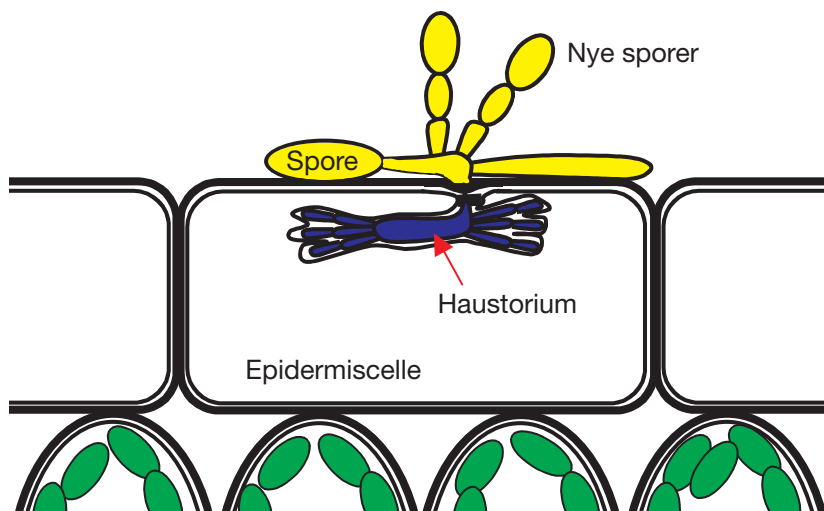
Vi kan også se, at der opstår en situation, hvor den angrebne plantecelle tiltrækker næringsstoffer fra de omgivende planteceller. Det er sikkert det, der forårsager såkaldte green islands, og det kommer til udtryk ved, at plantevævet under meldugkolonierne kan forblive grønt i længere tid end resten af bladet, når det gulnes og dør sidst på sæsonen.

For at kunne studere haustorierne nærmere, bestemte vi os for at forsøge at oprense dem, og det er faktisk lykkedes os at udvikle en velegnet metode.

Vi starter med stærkt inficerede bygblade med mange haustorier pr. celle. Vi blender bladene, filtrerer og centrifugerer bladdelene, men er alligevel i stand til at separere haustorierne fra det øvrige bladmateriale. Derefter laver vi ganske omstændelige proteomicsanalyser på materialet, og resultatet bliver en liste af kendte proteiner, som vi kan se kommer enten fra meldugsvampen eller fra bygplanten. Listen indeholder også en del overraskelser, og opgaven er nu ved andre metoder at



Øverst ses byg epidermisvæv med mange haustorier, nederst oprensede haustorier.



Skitse af bladudsnit med et tidligt stadium af en meldugkoloni. Det ses, hvordan haustoriet er placeret i epidermiscellen, og hvordan nye sporer dannes.

bekræfte, at disse proteiner reelt kommer fra haustoriet eller den omgivende plantemembran.

Nye gener fra både byg og meldugsvampen

I vores proteomics analyser havde vi forventet, at langt flere proteiner kunne identificeres i haustoriet og den medfølgende plantemembran. Men vi tror, at resultatet er begrænset af størrelsen på DNA-sekvensdatabasen, som proteinerne bliver matchet mod under analysen. Vi havde håbet, at databaser fra andre svampe som f.eks. gær ville være til større hjælp. Derfor er vi nu i færd med at udvide sekvensdatabasen med flere byg- og melduggener, som kan være relevante for os. Det foregår ved, at vi på basis af transskripter laver et bibliotek med DNA-kloner fra de to organismer. Vi bruger primært isoleret epidermisvæv med mange haustorier. Heri vil der være en kraftig berigning for transkripter, der koder for netop de proteiner, som vi er interesserede i.

Det egentlige sekventeringsarbejde vil vi ikke foretage selv. Det er i dag

mest hensigtsmæssigt at få det foretaget kommercielt. Som i så mange andre sammenhænge hvor der skal laves rutinepræget arbejde, kan dette arbejde med fordel laves i Kina. Vi vil derfor sende materialet til Beijing Genome Institute, m.h.p. sekventering af nogle tusinde kloner.

Perspektiver

Med VILLUM KANN RASMUSSEN FONDENs støtte etablerer vi på denne måde en solid basis for det langsigtede mål med arbejdet, som er at fostre ideer til, hvordan man kan skabe meldugresistens, som er bedre og lettere at håndtere end den klassiske resistens, som forædlerne typisk krydser ind i deres materiale. I arbejdet med haustoriet og dets funktion forventer vi at finde plante-funktioner, som svampen er afhængig af i sit symbiotiske samliv med plantecellen. Baseret på de proteiner, som vi har identificeret, har vi nu ideer til, hvilke funktioner, vi kan fokusere på i vores studier fremover.

En oplagt vej er at mutere symbioserelaterede plantegener og efterfølgende at se om planterne er resistent.

te. Alternativt vil vi kunne transformere planter, og søge at fremstille transgene linier med samme egenskaber. Her vil fordelene være, at vi vil kunne slukke for gener netop, når og kun når svampen angriber. I en mutant er genet slukket permanent, og det kan i visse tilfælde give utilsigtede vækstproblemer for planten.

POWDERY MILDEW RESEARCH

Many plant species get attacked by powdery mildew fungi, which cause problems on ornamentals and crop plants. Powdery mildew is a serious disease on the cereals barley and wheat, and resistance commonly introduced into cultivars of these plants is rapidly broken, when the fungi develop new virulent races. A fascinating biology is hidden in the interaction between the plants and these fungi. The fungus can only survive on living plant tissue, and establishes so-called haustoria inside cells of the plant. Here an intimate symbiosis is established, where the two organisms are separated only by a plant derived membrane. We know very little about how this symbiosis functions, but it appears that the fungus takes control of the invaded plant tissue, by transmitting certain proteins to the cells of the plant.

With the support from the VILLUM KANN RASMUSSEN FONDEN, we pursue studies of genes and proteins important for the interaction. We have managed to purify the fungal haustoria, and are performing comprehensive analyses of their proteins. We have identified a surprisingly large family of 36 fungal genes, which we believe codes for some of the control proteins transmitted to the plant.