



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2012 – 2013

Identificatie en functionele studie van effectormoleculen
in *Meloidogyne graminicola*

Britt Merlaen

Promotor: Prof. dr. Godelieve Gheysen

Tutor: dr. ir. Annelies Haegeman

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: cel- en genbiotechnologie

"Where a plant is able to live, a nematode is able to attack it" [1]

De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

Britt Merlaen

prof. dr. G. Gheysen

juni 2013

Woord vooraf

Graag wil ik iedereen bedanken die mij geholpen heeft deze masterproef tot een goed einde te brengen.

In de eerste plaats bedank ik mijn promotor, prof. dr. Godelieve Gheysen, voor het mogelijk maken van dit onderzoek en voor haar advies. Daarnaast een speciaal woord van dank voor mijn begeleidster, dr. ir. Annelies Haegeman. Haar begeleiding heeft in grote mate bijgedragen tot de realisatie van deze masterscriptie. Ook bedank ik alle andere mensen van de NEMA-groep binnen de vakgroep Moleculaire Biotechnologie voor hun goede raad en hulp, in het bijzonder Lander, Lien, Mei, Kamrun en Tina.

Tot slot wens ik ook familie en vrienden te bedanken voor hun steun en voor het nalezen van bepaalde onderdelen van deze scriptie.

Samenvatting

Het doel van deze thesis is informatie te verzamelen die kan bijdragen tot de identificatie en functie bepaling van effectors in de plantenparasitaire wortelknobbelnematode *Meloidogyne graminicola*. Effectors zijn eiwitten die door de nematode in de gastheerplant worden gesecreteerd en die de structuur en/of functie van de gastheercel kunnen veranderen. De nematode secreteert deze effectors voornamelijk via het stylet met als bedoeling een infectie mogelijk te maken. De voornaamste gastheerplant voor *Meloidogyne graminicola* is rijst. De schade die de parasiet aanricht aan de productie is vaak aanzienlijk. Identificatie van effectors vormt de basis voor de ontwikkeling van nieuwe bestrijdingsstrategieën zoals transgene resistente planten of nieuwe nematiciden.

Identificatie en functie bepaling zijn deels met elkaar vervlochten. Technieken die vandaag courant worden gebruikt in de zoektocht naar nematoden-effectors zijn *Expressed Sequence Tag* (EST)-analyse van een cDNA-bibliotheek van de inhoud van de faryngeale klieren, in-situ hybridisatie, *yeast-2-hybrid*, *RNA interference*, subcellulaire lokalisatie en expressie in transgene planten.

Voorafgaand aan deze thesis werden reeds op basis van een EST-databank van *Meloidogyne graminicola* en m.b.v. bio-informatica potentiële effectors opgesteld. Deze lijst vormde het uitgangspunt voor dit onderzoek. In een eerste stap werd voor enkele genen op de lijst nagegaan waar in de nematode ze tot expressie komen. In-situ hybridisatie toonde expressie van UK67 in de faryngeale klieren, wat een sterke indicatie is voor effectoridentiteit. Vooraf werd expressie in deze klieren ook al aangetoond voor UK28, UK50 en UK52. UK8 komt tot expressie in de amfiden, eveneens een indicatie voor effectoridentiteit. Omwille van deze resultaten werd verder gewerkt met deze vijf genen.

UK8 Er werd getracht het UK8-gen te *silencen* in J2-nematoden. De *silencing* bleek echter niet succesvol. Opregulatie of gelijke expressie t.o.v. de controlestalen werd bekomen i.p.v. neerregulatie. Een infectieproef met de behandelde nematoden leverde geen statistisch significante resultaten op, doch wel een niet-significante aanwijzing voor effectoridentiteit van UK8. De kans op het vinden van een interactiepartner in rijst via *yeast-2-hybrid* is klein, het is dan ook niet verwonderlijk dat er in dit experiment geen werden gevonden voor UK8. Men kan in de toekomst dit experiment herhalen, de kans dat er dan toch een interactor wordt gevonden is opnieuw klein, maar nog steeds reëel. Ook werden er in dit onderzoek J4- en volwassen nematoden verzameld. Expressie van UK8 kon enkel worden aangetoond in het J4-stadium en het is reeds geweten dat er ook expressie is in het J2-stadium. Men zou kunnen vermoeden dat er expressie is in alle juveniele stadia en dat dit gekoppeld is aan een functie in onderdrukking van plantenafweer of initiatie en onderhoud van de voedingsplaats, maar deze vermoedens zijn zeer voorbarig. Tot slot was UK8 niet in staat de afweer-*pathway* opgewekt door de hier toegepaste resistentie- en avirulentiegenen te onderdrukken. Er

kan dus geen besluit worden genomen over een eventuele functie in onderdrukking van de plantenafweer.

UK28 Expressie van UK28 kon niet aangetoond worden, noch in het J4-stadium, noch in het adulte stadium. Dit kan betekenen dat enkel de eerste levensstadia het gen tot expressie brengen. Dit zou wijzen op een functie tijdens de infectie en/of initiatie van de reuzencellen. De plantenafweer-*pathway* opgewekt door de hier toegepaste resistentie- en avirulentiegenen kon ook niet onderdrukt worden door UK28. Er kan dus geen besluit worden genomen over een eventuele functie in onderdrukking van de plantenafweer.

UK50 De poging tot *silencing* van UK50 in J2-juvenielen was niet succesvol. De expressie was opgeregeleerd t.o.v. de controlestalen. Hieruit kan besloten worden dat het protocol moet geoptimaliseerd worden. UK50 komt tot expressie in J2, J4 en adulte stadia. Dit doet vermoeden dat het gen gedurende de volledige levenscyclus tot expressie komt en dus waarschijnlijk een rol speelt in het afweren van de plantenimmuunrespons. De expressie in het adulte stadium is hoger dan in het J4-stadium, dit is mogelijk een artefact te wijten aan de slechte RNA-kwaliteit. Het verschil is relatief klein en wijst dus wellicht niet op een adult-specifieke functie. UK50 was echter niet in staat de afweer-*pathway* door de hier toegepaste resistentie- en avirulentiegenen te onderdrukken. De transformatie van rijst leverde vijf planten op die het UK50-gen bezitten. Wanneer blijkt dat de nematodegenen ook tot expressie komen en er homozygote planten zijn gevormd door zelfbestuiving, zullen deze planten worden gebruikt voor verdere studie van UK50. Onder andere infectieproeven op deze planten en het expressieniveau van bepaalde rijstgenen in deze planten kunnen waardevolle informatie opleveren.

UK52 De poging tot *silencing* van UK52 in J2-juvenielen was niet succesvol: i.p.v. neerregulatie werd opregulatie geobserveerd. Weinig geschikte protocols voor RNA-extractie uit nematoden en bijgevolg RNA van slechte kwaliteit kunnen hiervan aan de basis liggen. Een andere strategie voor *silencing* kan eventueel nodig zijn. UK52 komt zowel in J2, J4 als adulte stadia tot expressie. Het zou dus kunnen dat er expressie is tijdens de volledige levenscyclus, wat kan wijzen op een functie in het onderdrukken van de plantenafweer. De expressie in het adulte stadium is lager dan in het J4-stadium. UK52 was echter eveneens niet in staat de afweer-*pathway* door de hier toegepaste resistentie- en avirulentiegenen te onderdrukken. De transformatie van rijst leverde één plant op die het UK52 gen bezit. Indien het gen tot expressie komt, kunnen de nakomelingen van deze plant gebruikt worden voor verder onderzoek zoals bij UK50.

UK67 Expressie van UK67 in J4- en adulte stadia kon niet worden aangetoond. Van dit gen is enkel geweten dat het tot expressie komt in het J2-stadium, zoals aangetoond werd in dit onderzoek d.m.v. in-situ hybridisatie. Dit kan wijzen op een functie in infectie of initiatie van de voedingsplaats.

Het feit dat er noch voor UK50, UK52 of UK8 *silencing* kon worden aangetoond m.b.v. het toegepaste protocol kan te wijten zijn aan de relatief slechte kwaliteit van het geëxtraheerde RNA of aan het feit dat de *silencing* in deze specifieke omstandigheden niet werkt. Het lijkt aangewezen in de eerste plaats het protocol voor RNA-extractie uit nematoden te optimaliseren. Indien dan nog geen succesvolle *silencing* wordt bekomen, kan men kijken of gebruik van dubbelstrengig RNA (dsRNA) i.p.v. *small interfering* RNA (siRNA) betere resultaten oplevert. Succesvolle *silencing* biedt uitzicht op commercialisatie van resistente transgene planten.

Er werden nematoden uit verschillende levensstadia verzameld met de bedoeling expressie van potentiële effectors te vergelijken tussen deze levensstadia. De infectieproef was minder succesvol dan verwacht, waar-

door enkel voldoende RNA van aanvaardbare kwaliteit uit stadium J4 en het adulte stadium kon worden verzameld. Daarbij moet men ook opmerken dat het geëxtraheerde RNA voornamelijk bestaat uit planten-RNA, met slechts een kleine concentratie nematoden-RNA. Wanneer expressie niet kon worden aangetoond, kan dit ook te wijten zijn aan deze lage concentratie. Afwezigheid van expressie kan dus niet met zekerheid gesteld worden.

Identificatie en functiebevestiging van effectors is een langdurig proces. De hier verzamelde aanwijzingen zijn een eerste stap in de richting van het identificeren van effectors in *Meloidogyne graminicola*.

Lijst van figuren

2.1	Stylet van een <i>Meloidogyne graminicola</i> nematode	8
2.2	Vrouwelijke volwassen nematode van <i>Meloidogyne</i> en eimassa	9
2.3	Volwassen mannelijke wortelknobbelnematode die zich in de cuticula van de juveniele stadia bevindt	12
2.4	Schematische voorstelling van de levenscyclus van <i>Meloidogyne</i>	12
2.5	Schematische voorstelling van de levenscyclus van <i>Meloidogyne</i>	12
2.6	Schematische voorstelling van de levenscyclus van <i>Meloidogyne</i>	13
2.7	Groei van rijst-zaailingen in met <i>Meloidogyne graminicola</i> besmette grond (furadan 5G)	13
2.8	Groei van rijst-zaailingen in met <i>Meloidogyne graminicola</i> besmette grond	13
2.9	Gal op de wortels van Nipponbare veroorzaakt door <i>Meloidogyne graminicola</i>	14
2.10	Haakvormige gal op de wortels van Nipponbare veroorzaakt door <i>Meloidogyne graminicola</i>	14
2.11	Schematische voorstelling van de interactie tussen een plant en wortelknobbel- (links) of cystnematoden (rechts)	16
2.12	Schematische voorstelling van het zigzag-model	19
2.13	Schematische voorstelling van een typische plantenparasitaire nematode met aanduiding van de belangrijkste secretorische organen	20
3.1	Vectormap van de pGEM-T vector	28
3.2	Vectormap van de pDONR221 vector	37
3.3	Vectormap van de pDEST32 vector	38
3.4	Vectormap van de pDEST22 vector	38
3.5	Vectormap van de pK7WG2 vector	43
3.6	Vectormap van de pMb7Fm21GW-UBIL vector	46
4.1	Visualisatie van de PCR-producten na amplificatie van 18 verschillende fragmenten uit nematode-cDNA	51
4.2	In-situ hybridisatie: DIG-gelabelde probes	52
4.3	In-situ hybridisatie (UK67)	53
4.4	Test-PCR op cDNA van nematoden behandeld met UK50- of UK52-siRNA's	55
4.5	Semikwantitatieve RT-PCR met <i>ACT2</i> -primers	57
4.6	Semikwantitatieve RT-PCR met genspecifieke primers	57
4.7	Aantal gallen geïnduceerd door nematoden behandeld met UK8-siRNA	60
4.8	Kolonie-PCR op <i>E.coli</i> getransformeerd met verschillende plasmiden	62

4.9	Transformatie van gist met <i>bait</i> -plasmide	62
4.10	Transformatie van gist met <i>bait</i> en leeg <i>prey</i> plasmide	62
4.11	Transformatie van gist: negatieve controle	62
4.12	Autoactivatietest UK8: <i>-trp-leu</i> medium	64
4.13	Autoactivatietest UK8: <i>-trp-leu-uracil</i> medium	64
4.14	Autoactivatietest UK8: <i>-trp-leu-his</i> medium	64
4.15	Autoactivatietest UK8: X-gal	64
4.16	Verdere selectie na bibliotheekscreening UK8: <i>-trp-leu</i> medium	65
4.17	Verdere selectie na bibliotheekscreening UK8: <i>-trp-leu-uracil</i> medium	65
4.18	Verdere selectie na bibliotheekscreening UK8: <i>-trp-leu-his</i> medium	65
4.19	Verdere selectie na bibliotheekscreening UK8: X-gal <i>assay</i>	65
4.20	Kolonie-PCR op <i>Agrobacterium</i> getransformeerd met pK7WG2-plasmiden	67
4.21	Transiënte expressie: negatieve controles UK8 en UK28	68
4.22	Transiënte expressie: negatieve controles UK50 en UK52	68
4.23	Transiënte expressie: co-infiltratie: UK28 en UK8	69
4.24	Transiënte expressie: co-infiltratie: UK50 en UK52	69
4.25	Kolonie-PCR van <i>Agrobacterium</i> getransformeerd met pMBb7Fm21GW-UBIL met UK50	71
4.26	Regeneratie van UK50-getransformeerd callus	71
4.27	Regeneratie van UK52-getransformeerd callus	71
4.28	PCR potentieel transgene planten: UK50	72
4.29	PCR potentieel transgene planten: UK52	73
5.1	In-situ hybridisatie (UK28)	76
5.2	In-situ hybridisatie (UK50)	76
5.3	In-situ hybridisatie (UK52)	76
5.4	In-situ hybridisatie (UK8)	76
D.0.1	Promotor en multikloneringssite van de pGEM-T vector	121
D.0.2	Multikloneringssite van de pDEST22 vector	122
D.0.3	Multikloneringssite van de pDEST32 vector	122

Lijst van tabellen

2.1	Classificatie van het genus <i>Meloidogyne</i>	8
4.1	Resultaten van de <i>blasts</i> tegen verschillende databanken met de eiwitsequenties van de nematodegenen UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67	54
4.2	Concentraties RNA na extractie uit siRNA-behandelde nematoden (UK50 en UK52)	55
4.3	Hoeveelheden cDNA in semikwantitatieve RT-PCR	56
4.4	Opregulatie van UK50 in nematoden behandeld met siRNA gericht tegen dit gen vergeleken met nematoden uit twee controlebehandelingen	58
4.5	Concentratie en kwaliteitsindicatie van siRNA's	59
4.6	Concentraties RNA na extractie uit siRNA-behandelde nematoden (UK8)	59
4.7	Opregulatie van UK8 in nematoden behandeld met siRNA	60
4.8	Expressie van potentiële effectorgenen in verschillende stalen	66
4.9	Kruistabel van de scores uit de <i>immuno suppression assay</i> met UK8	69
4.10	Kruistabel van de scores uit de <i>immuno suppression assay</i> met UK28	69
4.11	Kruistabel van de scores uit de <i>immuno suppression assay</i> met UK50	69
4.12	Kruistabel van de scores uit de <i>immuno suppression assay</i> met UK52	69
4.13	p-waarden van de <i>Fisher's exact test</i>	70
5.1	Overzicht	85
A.1.1	Callus inducerend medium (CIM)	99
A.1.2	YEB-medium	99
A.1.3	LB-medium	99
A.1.4	Tris-acetaat-EDTA (TAE)-buffer	99
A.1.5	AA Aminozuren (20x stock)	99
A.1.6	R2COMAS-medium	99
A.1.7	Acetosyringone	100
A.1.8	AA-1	100
A.1.9	N6-selectiemedium	100
A.1.10	N6-preregeneratiemedium	100
A.1.11	N6-regeneratiemedium	100
A.1.12	Rijst-wortelinducerend medium	100
A.2.1	SOC-medium	100
A.3.1	M9-buffer	101

A.3.2	Paraformaldehyde in M9-buffer	101
A.3.3	DEPC-water	101
A.3.4	Hybridisatiebuffer	101
A.3.5	4xSSC	101
A.3.6	<i>Maleic acid</i> buffer	101
A.3.7	Detectiebuffer	101
A.3.8	Kleuroplossing	101
A.4.1	H5 stock oplossing	102
A.4.2	Hoagland	102
A.6.1	Infiltratiebuffer	107
J.1.1	Scores toegekend bij de evaluatie van de negatieve controles horende bij de <i>immuno suppression assay</i> met UK8 en UK28	137
J.1.2	Scores toegekend bij de evaluatie van de negatieve controles horende bij de <i>immuno suppression assay</i> met UK50 en UK52	137
J.1.3	Scores toegekend bij de evaluatie van de <i>immuno suppression assays</i> met potentiële effectors UK8 en UK28	137
J.1.4	Scores toegekend bij de evaluatie van de <i>immuno suppression assays</i> met potentiële effectors UK50 en UK52	139

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	1
1 Inleiding	3
2 Literatuurstudie	7
2.1 Rijstteelt	7
2.2 <i>Meloidogyne</i> sp.	8
2.2.1 Taxonomie	8
2.2.2 Morfologie	8
2.2.3 Levenscyclus	9
2.2.4 Reproductie	12
2.2.5 Schadebeeld en economisch belang	13
2.2.6 Overleving in de bodem	14
2.2.7 Bestrijding	15
2.3 Andere economisch belangrijke nematoden	16
2.3.1 Cystnematoden	16
2.3.2 Migratorische endoparasitaire nematoden	16
2.3.3 Ectoparasitaire nematoden	17
2.4 Moleculaire plant-nematode interacties	17
2.4.1 Zigzag-model	17
2.4.2 Aflevering van effectors in het plantenweefsel	19
2.4.3 Effectorfuncties	20
2.5 Identificatie en functionele studie van effectormoleculen	23
2.5.1 Identificatie	23
2.5.2 Functionele studie	24
3 Materiaal en methoden	27
3.1 Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector	27
3.1.1 Vermenigvuldiging van de fragmenten	27
3.1.2 Ligatie in pGEM-T vector	28
3.1.3 Vermenigvuldiging van de vector in <i>E. coli</i>	28
3.1.4 Opzuiveren van de vectors uit <i>E. coli</i>	29
3.2 Lokalisatie van expressie	29

3.2.1	Gelabelde probes maken	29
3.2.2	Extractie van nematoden uit rijstwortels	30
3.2.3	Fixatie van de nematoden	30
3.2.4	Versnijden van de nematoden	30
3.2.5	Permeabilisatie	31
3.2.6	Hybridisatie	31
3.2.7	Wassen	31
3.2.8	Kleuren	31
3.2.9	Bekijken onder de microscoop	32
3.3	<i>Blasten</i> van potentiële effectorgen	32
3.4	<i>Silencing</i> van potentiële effectorgen	32
3.4.1	Ontwerpen van siRNA's (<i>small interfering RNA's</i>)	32
3.4.2	Synthese van siRNA's	33
3.4.3	Extractie van nematoden uit rijstwortels	33
3.4.4	Behandelen van nematoden	33
3.4.5	RNA-extractie	33
3.4.6	DNase-behandeling	33
3.4.7	cDNA-synthese	33
3.4.8	Semikwantitatieve RT-PCR	34
3.4.9	Q-RT-PCR	34
3.4.10	Analyse van Q-RT-PCR data	34
3.5	Infectieproef met siRNA-behandelde nematoden	35
3.5.1	Kweken van rijstplantjes	35
3.5.2	Infectie van rijstplantjes	35
3.5.3	Fuchsine-kleuring	35
3.5.4	Tellen van het aantal gallen	35
3.5.5	Analyse van de data	36
3.6	<i>Yeast-2-hybrid</i>	36
3.6.1	Gateway klonering	36
3.6.2	Vorbereiding	38
3.6.3	Transformatie van giststam met <i>bait</i> en <i>bait + lege prey</i>	39
3.6.4	Autoactivatietest	40
3.6.5	Bibliotheekscreening	40
3.6.6	Verdere selectie van de gistkolonies die groeiden op <i>-trp-leu-his</i> medium	41
3.6.7	X-gal <i>assay</i>	41
3.7	Vergelijking van expressie van effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode	42
3.7.1	Extraheren van nematoden uit rijstwortels	42
3.7.2	Kweken en infecteren van rijstplantjes	42
3.7.3	Verzamelen van de gallen	42
3.7.4	RNA-extractie uit gallen	42

3.7.5	DNase-behandeling en cDNA-synthese	42
3.7.6	Q-RT-PCR en analyse van Q-RT-PCR data	42
3.8	Transiënte expressie in tabak	42
3.8.1	Gateway klonering	42
3.8.2	Transformatie van <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
3.8.3	Vorbereiding	44
3.8.4	Infiltratie	44
3.8.5	Evaluatie	45
3.8.6	Statistische analyse	45
3.9	Transformatie van rijst	45
3.9.1	Callusvorming	45
3.9.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -transformatie	46
3.9.3	<i>Agrobacterium</i> -gemedieerde callustransformatie	47
3.9.4	Selectie van getransformeerde calli	48
3.9.5	Regeneratie	48
3.9.6	Testen van aanwezigheid van het gen	49
4	Resultaten	51
4.1	Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector	51
4.2	Lokalisatie van expressie	52
4.2.1	Constructie van de probes	52
4.2.2	In-situ hybridisatie	53
4.3	<i>Blasten</i> van de potentiële effectors UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67	53
4.4	<i>Silencing</i> van potentiële effectors	54
4.4.1	UK50 en UK52	54
4.4.2	UK8	58
4.5	Zoeken naar interactiepartners	60
4.5.1	Gateway klonering	61
4.5.2	Sequentie-analyse	61
4.5.3	Transformatie van de giststam met <i>bait</i> -plasmide en <i>bait</i> -plasmide + leeg <i>prey</i> -plasmide	62
4.5.4	Autoactivatie	63
4.5.5	Bibliotheekscreening	63
4.5.6	Transformatie-efficiëntie	63
4.5.7	Verdere selectie	64
4.6	Vergelijking van expressie van potentiële effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode	66
4.6.1	RNA-extractie uit gallen	66
4.6.2	Q-RT-PCR	66
4.7	Onderdrukking van de plantenafweer	67
4.7.1	Gateway klonering	67
4.7.2	Sequentie-analyse	67

4.7.3	Transformatie van <i>Agrobacterium</i>	67
4.7.4	<i>Immuno suppression assay</i>	68
4.8	Expressie in rijst	70
4.8.1	Transformatie van <i>Agrobacterium</i>	70
4.8.2	Regeneratie	71
4.8.3	Testen van de aanwezigheid van het gen	72
5	Discussie	75
5.1	Lokalisatie van expressie	76
5.2	<i>Silencing</i> van potentiële effectors	77
5.3	Zoeken naar interactiepartners	79
5.4	Vergelijking van expressie van potentiële effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode	81
5.5	Onderdrukking van de plantenafweer	82
5.6	Expressie in rijst	83
5.7	Verder onderzoek	84
5.8	Overzicht	84
6	Besluit	87
	Bibliografie	89
	Appendices	99
A	Media en oplossingen	99
A.1	Rijsttransformatie	99
A.2	Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector	100
A.3	Lokalisatie van expressie	101
A.4	Hoagland-oplossing	102
A.5	<i>Yeast-2-hybrid</i>	102
A.6	Transiënte expressie in tabak	107
B	Sequenties UK8, UK18, UK50, UK52 en UK67: genen, siRNA's, primers	109
C	Sequenties UK18, UK23, UK44, UK63, UK64, UK65, UK66, UK68, UK69, UK70, UK71, UK72, UK73, UK74, UK75, UK76: genen en primers	115
D	Multikloneringsites pGEMt, pDEST22 en pDEST32	121
E	REST-analyse RNAi-experiment (UK50): eerste biologische replica	123
E.1	Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	123

E.2	Staal: UK50A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	124
E.3	Staal: UK50A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	124
E.4	Staal: UK50B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	125
E.5	Staal: UK50B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	125
F	REST-analyse RNAi-experiment (UK50 en UK52): tweede biologische replica	127
F.1	Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50	127
F.2	Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK52	128
G	REST-analyse RNAi-experiment (UK8)	129
G.1	Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8	129
G.2	Staal: UK8A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8	130
G.3	Staal: UK8A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8	130
G.4	Staal: UK8B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8	131
G.5	Staal: UK8B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8	131
H	Infectieproef met UK8-siRNA-behandelde nematoden	133
H.0.1	Aantal gallen geïnduceerd op de wortels	133
H.0.2	SPSS-analyse van de data in sectie H.0.1	133
I	Vergelijking van expressie van effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode	135
I.1	Expressie van UK50	135
I.2	Expressie van UK52	136
J	Transiënte expressie	137
J.1	Scores	137
J.2	Statistische analyse	140
J.2.1	Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weergegeven in tabel 4.9 (UK8)	140
J.2.2	Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weergegeven in tabel 4.10 (UK28)	140

J.2.3	Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weergegeven in tabel 4.11 (UK50)	141
-------	--	-----

Lijst met afkortingen

ANOVA	(Eng.) <i>Analysis of variance</i>
Avr-gen	Avirulentiegen
Blast	(Eng.) <i>Basic local alignment search tool</i>
cDNA	Complementair DNA
CIM	Callus inducerend medium
DIG	Digoxigenine
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	Desoxyribonucleotide trifosfaat
dsRNA	dubbelstrengig RNA
EST	(Eng.) <i>Expressed sequence tag</i>
ETI	(Eng.) <i>Effector triggered immunity</i>
ETS	(Eng.) <i>Effector triggered susceptibility</i>
F-primer	(Eng.) <i>Forward primer</i>
GFP	Groen fluorescent proteïne
HR	Hypersensitieve respons
OD	Optische dichtheid
PAMP	(Eng.) <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase ketting reactie (Eng.: <i>Polymerase chain reaction</i>)
PTI	(Eng.) <i>Pathogen triggered immunity</i>
Q-RT-PCR	Kwantitatieve RT-PCR (Eng.: <i>Quantitative RT-PCR</i>)
R-gen	Resistentiegen
RNA	Ribonucleïnezuur
RNAi	(Eng.) <i>RNA interference</i>
ROS	Reactieve zuurstof species (Eng.: <i>reactive oxygen species</i>)
R-primer	(Eng.) <i>Reverse primer</i>
RT-PCR	(Eng.) <i>Reverse transcriptase PCR</i>
SAP	Synthetisch absorberend polymeer
siRNA	(Eng.) <i>Small interfering RNA</i>

Hoofdstuk 1

Inleiding

Rijst is het voornaamste voedingsmiddel voor meer dan de helft van de wereldbevolking. Daarnaast is het ook de enige bron van inkomsten voor een groot deel ervan, vaak minder goeden. In dat opzicht is het van groot belang de rijstvoorziening stabiel te houden en ervoor te zorgen dat in de toekomst de stijgende vraag naar rijst nog steeds kan ingelost worden.

Dit houdt onder andere in dat de teelten moeten beschermd worden tegen pathogenen die voor opbrengst- of kwaliteitsvermindering van het graan zorgen. Naast insecten, schimmels en bacteriën zorgen ook nematoden voor aanzienlijke economische schade. Er wordt onderscheid gemaakt tussen ectoparasitaire en endoparasitaire nematoden. Deze laatste dringen met hun volledige lichaam de plantenwortel binnen. Migratorische endoparasitaire nematoden blijven migreren door de wortel op zoek naar nieuw voedsel, dit in tegenstelling tot de sedentaire nematoden die een voedingsplaats aanleggen en daar ter plaatse blijven om hun levenscyclus te vervolmaken. Zowel cystnematoden als wortelknobbelnematoden behoren tot de groep van endoparasitaire, sedentaire nematoden. Alle wortelknobbelnematoden behoren tot het geslacht *Meloidogyne*. Wortelknobbelnematoden zijn obligaat parasitaire plantenpathogenen die bijna alle hogere plantensoorten wereldwijd kunnen infecteren. Ze danken hun naam aan het meest opvallende symptoom van een geïnfecteerde plant: de wortelknobbels of gallen. De nematoden veroorzaken deze symptomen door de fysiologie van de plant te verstoren m.b.v. effectors. Dit zijn eiwitten die door de nematode in de plant worden gesecreteerd en die de structuur en functie van de gastheercel veranderen. *Meloidogyne graminicola* is de schadelijkste wortelknobbelnematode in rijst.

Gezien de groeiende impact die de mens heeft op de planeet is het noodzakelijk om onder andere de rijstvoorziening op een efficiënte en duurzame manier te verzorgen. Om een nematode-infectie in rijst te bestrijden zijn chemische middelen het meest effectief en het meest geschikt (zie sectie 2.2.7). Voor het ontwikkelen van nieuwe nematiciden en vooral voor het ontwikkelen van duurzame resistenties in rijst is het noodzakelijk om te weten hoe de nematode een infectie bewerkstelligt.

Het is geweten dat nematoden door hun stylet verschillende eiwitten secreteren in de plant met als doel deze plant te infecteren. Deze eiwitten worden effectors genoemd en worden meestal geproduceerd in de faryngeale klieren, maar daarnaast is ook secretie via de amfiden of fasmiden mogelijk (zie sectie 2.4.3). Effectors worden gedefinieerd als "alle eiwitten en kleine moleculen geproduceerd door pathogenen en schadelijke dieren die de structuur en functie van de gastheercel veranderen ongeacht het feit of deze veranderingen de infectie vergemakkelijken of een afweerrespons opwekken bij de gastheer" [2]. De nematode tracht m.b.v.

deze effectors een infectie mogelijk te maken. Belangrijke effectorfuncties zijn onder meer het afbreken van de plantencelwand om migratie mogelijk te maken, het onderdrukken van de plantenafweer en het aanleggen van een voedingsplaats (zie sectie 2.4.3). De plant beschikt echter over mechanismen om zich te beschermen tegen pathogenen. Planten zijn in de eerste plaats in staat om de aanwezigheid van pathogenen op te merken aan de hand van PAMP's (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), waarna ze zich verdedigen met onder andere reactieve zuurstof species (ROS). Deze vorm van immuniteit wordt benoemd als PTI (*Pathogen Triggered Immunity*). Zoals reeds eerder vermeld secreteren nematoden effectors in de plant; deze dienen onder andere om de plantenafweer te omzeilen, waardoor de plant zijn immuniteit verliest. Men spreekt van ETS (*Effector Triggered Susceptibility*). De plant heeft in de loop van de evolutie echter de mogelijkheid verworven om deze effectors of hun effecten te herkennen, waarna vaak een hypersensitieve respons wordt geïnduceerd. De immuniteit die op deze manier verworven wordt, heet ETI (*Effector Triggered Immunity*). Via evolutie van bestaande effectors of het verwerven van effectors kan de nematode er echter alsnog in slagen de plant te infecteren. Deze opeenvolging van immuniteit en gevoeligheid wordt beschreven in het zigzag-model (zie sectie 2.4.1). De plantengenen die de functie dragen voor het herkennen van de effectors worden resistentiegenen of R-genen genoemd. De genen die coderen voor effectors die herkend worden door een resistentiegen worden ook avirulentiegenen of Avr-genen genoemd.

Dit zigzag-model vormt de basis voor het ontwikkelen van resistente rijstplanten. Immers, wanneer men nieuwe R-genen kan binnenbrengen in het genoom van de plant dan verwerft deze immuniteit (ETI). De keuze van de R-genen is van belang om een zo duurzaam mogelijke resistentie uit te bouwen: wanneer dit gen instaat voor de herkenning van een effector die cruciaal is voor de nematode, dan zal het zeer lang duren voor deze effector geëvolueerd is en buiten de herkenning van het R-gen valt. Duurzame resistentie kan ook bekomen worden door meerdere R-genen tegelijk in te bouwen opdat de resistentie nog niet doorbroken wordt wanneer één effector muteert. Daarnaast is er ook de mogelijkheid om transgene gewassen te ontwikkelen die via dubbelstrengig RNA (dsRNA) bepaalde effectors *silencen*, m.a.w. verhinderen dat de effectoreiwitten worden aangemaakt. De haalbaarheid van een dergelijke aanpak werd reeds aangetoond, o.a. in een project waarbij transgene *Arabidopsis thaliana* werd gemaakt die dankzij *silencing* van een effectorgen via dubbelstrengig RNA (dsRNA) brede resistentie tegen wortelknobbelnematoden vertoonde [3].

Om resistente planten te ontwikkelen is het dus vooreerst noodzakelijk om de effectors te identificeren. Welke genen in het genoom van *Meloidogyne graminicola* coderen voor deze effectors? Op dit moment is daaromtrent nog zeer weinig informatie beschikbaar. Slechts een klein aantal effectors is reeds geïdentificeerd in plantenparasitaire nematoden, voor *Meloidogyne graminicola* is er zelfs nog geen enkele gekend. Het doel van deze thesis is dan ook het identificeren van genen die coderen voor effectors in het genoom van *Meloidogyne graminicola*. Door middel van verschillende experimenten werd geprobeerd aanwijzingen te verzamelen voor of tegen de effectoridentiteit van verschillende genen. Hiervoor werd uitgegaan van een lijst van potentiële effectors die voorafgaand aan dit onderzoek samengesteld werd op basis van een *Expressed Sequence Tags* (EST)-project van *Meloidogyne graminicola* [4]. De sequenties op de lijst worden benoemd als UK (wat staat voor *unknown*) gevolgd door een nummer. Het volledige genoom van deze nematode is nog niet gesequeneerd. Dit EST-project is tot op heden een van de meest volledige bronnen van genetische sequenties van *M. graminicola*. De door wetenschappers meest toegepaste technieken voor identificatie en functiebepaling van effectormoleculen vandaag de dag zijn EST-analyse van een cDNA-bibliotheek

van de inhoud van de faryngeale klieren, in-situ hybridisatie, *yeast-2-hybrid*, subcellulaire lokalisatie, RNAi (RNA *interference*) en het maken van transgene planten. Gedurende dit onderzoek werd getracht m.b.v. deze technieken extra informatie te verzamelen over genen op de lijst, met de bedoeling ze uiteindelijk als effector te kunnen benoemen of verwerpen.

Hoofdstuk 2

Literatuurstudie

2.1 Rijstteelt

Rijst is een belangrijk voedingsgewas wereldwijd, voornamelijk twee soorten worden geconsumeerd: *Oryza sativa* L. (geteeld wereldwijd) en *Oryza glaberrima* Steud. (geteeld in West-Afrika). In Afrika wordt de rijst voornamelijk *upland* geteeld (d.i. de bodem is niet waterverzadigd), waar in Azië rijst meestal gedeeltelijk onder water staat (*lowland*). Daarnaast is er ook de zogenaamde *flooded* of diepwater rijst, waarbij de bodem regelmatig sterk overstroomt [5]. 90% van alle rijst wordt geteeld in Azië, aangezien rijst het enige (graan)gewas is dat kan groeien in natte omstandigheden. Bovendien kan rijst ook eeuwenlang op hetzelfde stuk grond geteeld worden, zonder vruchtwisseling. Op die manier kan men tot drie maal per jaar oogsten. In Azië is het telen van rijst dan ook de belangrijkste economische activiteit van meer dan 200 miljoen mensen op het platteland. Rijst is ook het voornaamste voedingsmiddel voor meer dan de helft van de wereldbevolking, vaak de armsten, die gevoelig zijn voor prijsstijgingen ten gevolge van schaarste. Wanneer zoveel mensen rechtstreeks afhankelijk zijn van de rijstopbrengst (hetzij voor hun voedselvoorziening, hetzij voor hun inkomen), is het niet verwonderlijk dat schaarste tot sociale onrust leidt. De uitdaging is dus om de vraag naar rijst, die voornamelijk in Afrika en Latijns-Amerika sterk groeit, te kunnen blijven invullen en dit op een ecologisch duurzame en efficiënte manier [6].

Om in de toekomst voldoende rijst te kunnen produceren is het onder andere van belang om ziektes en plagen onder controle te houden. Een economisch belangrijke ziekte is *rice blast*, veroorzaakt door de schimmel *Magnaporthe grisea*. Wereldwijd veroorzaakt deze ziekte opbrengstverliezen die oplopen tot 50 procent en plaatselijk zelfs tot 100 procent. Andere schimmelziektes die rijst aantasten zijn onder andere *brown spot* (*Bipolaris oryzae*), *sheath blight* (*Rhizoctonia solani*), *stem rot* (*Sclerotium oryzae*) en *sheath rot* (*Sarocladium oryzae*) [7]. Daarnaast zijn er ook schadelijke insecten, vb. de stengelboorder (*Chilo suppressalis*) en de *armyworms* (*Spodoptera mauritia*, *Spodoptera litura* en *Mythimna separata*) [8, 9]. Ook bacteriën kunnen flink wat schade aanrichten op rijst, bijvoorbeeld *Xanthomonas oryzae* die *bacterial leaf blight* veroorzaakt [10]. Een andere groep die ten slotte als limiterend voor de rijstproductie wordt beschouwd, is die van de nematoden. Er wordt onderscheid gemaakt tussen wortelknobbelnematoden, cystnematoden en migratorische nematoden (zie sectie 2.3). Alle wortelknobbelnematoden worden ondergebracht in het geslacht *Meloidogyne* [11, 12]. *M. graminicola* is de schadelijkste wortelknobbelnematode in rijst [4].

2.2 *Meloidogyne* sp.

2.2.1 Taxonomie

Jarenlang bestond er discussie over de classificatie van het genus *Meloidogyne*. In tabel 2.1 wordt deze volgens [13] weergegeven.

Tabel 2.1: Classificatie van het genus *Meloidogyne* [13]

Fylum	Nematoda
Klasse	Chromadorea
Orde	Rhabditida
Suborde	Tylenchina
Infraorde	Tylenchomorfa
Superfamilie	Tylenchoidea
Familie	Meloidogynidae
Genus	<i>Meloidogyne</i>

2.2.2 Morfologie

Nematoden in het algemeen zijn ongesegmenteerde, pseudocoelomate, draadvormige dieren (het Griekse *nema* betekent 'draad') [1].

De morfologie van *Meloidogyne* is duidelijk aangepast aan zijn endoparasitaire levensstijl. Het stylet en de faryngeale klieren zijn de opvallendste morfologische kenmerken. Doorheen het stylet worden secreties, geproduceerd in de faryngeale klieren, in de plant geïnjecteerd [14]. Daarnaast wordt dit stylet ook gebruikt om voeding op te nemen en om mechanische schade toe te brengen aan het plantenweefsel. Het stylet is tussen 9 en 18 μm lang en heeft aan de basis drie knobbels (Figuur 2.1). De faryngeale klieren bestaan uit drie cellen, waarvan twee subventraal gelegen en één dorsaal. De dorsale cel is het meest actief tijdens de sedentaire levensfase van de nematode, voor het ontwikkelen en onderhouden van de voedingsplaats. In de voorgaande, migratorische fasen en tijdens het initiëren van de voedingsplaats zijn het voornamelijk de twee subventrale cellen die actief secreteren [15].



Figuur 2.1: Scanning-elektronenmicroscopische opname van een uitgesneden stylet van een mannelijke *Meloidogyne graminicola* nematode [16]

Volwassen vrouwtjes zijn peervormig, hun verlengde nek is ingebed in de wortel, het dikkere uiteinde van hun lichaam blijft aan het oppervlak (Figuur 2.2). De *Meloidogyne* vrouwtjes verharderen niet tot een cyste zoals bij de cystnematoden. In tegenstelling tot andere *Meloidogyne* species, worden de eiermassa's van *M. graminicola* niet aan het oppervlak gelegd, maar binnenin de wortel [4]. Naast de faryngeale klieren beschikken de vrouwtjes ook nog over zes rectale klieren, eveneens unicellulair, die een gelatineuze substantie

secreteren om een eierzak te vormen waarin de eitjes dan worden gedeponerd (Figuur 2.2).



Figuur 2.2: Vrouwelijke volwassen nematode (female) van *Meloidogyne* en eimassa (egg mass) [17]

De *Meloidogyne graminicola* juvenielen die migreren door de bodem en nieuwe infecties veroorzaken (zij worden benoemd als J2-juvenielen), zijn ongeveer 0,41 tot 0,48 mm lang en ongeveer 15 μm breed. Ze zijn dus langwerpig van vorm en hun staart eindigt op een lange, fijne punt [11].

2.2.3 Levenscyclus

2.2.3.1 Het ei

Het embryo van een *Meloidogyne*-nematode ontwikkelt zich in een eitje dat zich in een eierzak bevindt. Deze heeft een gelatineuze structuur en bevindt zich doorgaans op het oppervlak van geïnfecteerde wortels, maar soms ook binnenin de gallen, zoals bij *Meloidogyne graminicola*. Het embryo ondergaat een eerste vervelling in het ei en komt zo in het tweede juveniel stadium (J2) terecht. Het tijdstip waarop de eitjes uitkomen wordt uitsluitend door de omgevingstemperatuur bepaald. Er zijn dus geen invloeden van de plant vereist, hoewel wortellexudaten soms een stimulerende invloed hebben. Bij het uitkomen van de eitjes wordt de eierschaal flexibeler, men vermoedt dat enzymen een rol spelen in het veranderen van de eierschaalstructuur [11]. Meerdere generaties per groeicyclus zijn mogelijk aangezien eitjes die vroeg tijdens de adulte levensfase worden gelegd onmiddellijk uitkomen. De eitjes die later worden gelegd, vaak onder ongunstige omstandigheden, zijn dormant. Men duidt dit aan met de term diapauze. Deze eitjes zorgen voor overdracht van de soort naar het volgende seizoen [11].

2.2.3.2 Het infectieve J2-stadium

Het J2-stadium, dat het ei verlaat, is het infectieve stadium. De J2-juvenielen komen in de bodem terecht en trachten de in de onmiddellijke omgeving aanwezige wortels binnen te dringen. Ze kunnen zowel reeds geïnfecteerde wortels binnendringen als wortels waar nog geen nematoden in aanwezig zijn [11]. Op deze manier verspreidt de infectie zich over verschillende planten, zij het over beperkte afstanden. Dit J2-stadium is, naast de volwassen mannetjes, het enige stadium dat mobiel is en vrijlevend in de bodem kan worden aangetroffen. Ze overleven hier dankzij de voedselreserves in hun darm, die ze uit het ei hebben meegekregen. Hoe langer ze in de bodem aanwezig blijven, hoe minder van deze voedingsstoffen er nog ter beschikking zijn. Vermits het infecteren van een plant energie vergt, daalt de infectiviteit van de nematoden dus naarmate ze langer in de bodem overleven [11].

Het juveniel heeft er dus baat bij zo snel mogelijk een gastheer te infecteren. Het J2-stadium wordt aangetrokken door een chemische gradiënt van wortellexudaten en lokaliseert op die manier de wortels. Er zijn echter veel stoffen die rondom de wortels een gradiënt vormen in de bodem; welke precies een invloed hebben op nematoden is niet geweten. CO_2 wordt beschouwd als één van de belangrijkste componenten. Dit verklaart echter niet de observatie dat infectueuze juvenielen soms veel sterker worden aangetrokken door wortels van gevoelige planten dan door deze van resistente planten. De infectueuze juvenielen verzamelen vaak op specifieke plaatsen rond de wortels, nl. net voorbij het wortelmutsje (d.i. de zone van celalongatie), ter hoogte van apicale meristemen of op infectieplaatsen van andere J2-nematoden, maar dit kan eender waar op de wortel gebeuren [11].

Er wordt een combinatie van mechanische kracht, nl. het steken met de stylet en enzymatische kracht, nl. door de nematode geproduceerde celwandafbrekende enzymen (zie sectie 2.4.3) toegepast om doorheen de celwanden te breken. De nematode beweegt zich verder intercellulair doorheen de cortex. Om een doorgang te maken worden de middenlamellen tussen de cellen afgebroken, waardoor de cellen gaan opzwellen. Slechts zelden zijn er aanwijzingen dat de nematoden zich ook voeden met deze cellen. Migrerend doorheen de cortex komt de nematode vervolgens de endodermis tegen, deze barrière is moeilijk te doorbreken en wordt door de J2-nematoden dan ook omzeild. Ze veranderen van koers en migreren richting apicaal meristeem, waar de endodermis nog niet gevormd is. Daar draaien ze 180 graden, waarna ze zich doorheen de vasculaire cilinder voortbewegen naar de zone van celdifferentiatie, waar ze sessiel worden [11]. Aangezien er net achter het wortelmutsje nog geen endodermis is gevormd, is het voor de nematode dus voordelig de wortel op die plaats binnen te dringen [17]. Eenmaal sessiel, bevindt het lichaam van de nematode zich parallel met de longitudinale as van de wortel in de cortex, terwijl de kop ingebed ligt in de buitenste laag van het vaatweefsel [11].

De levenscyclus van *Meloidogyne graminicola* verschilt op verschillende punten van deze van andere wortelknobbelnematoden. Zo blijven de juvenielen in de maternale gal aanwezig of migreren ze binnen dezelfde wortel op zoek naar een plaats om reuzencellen te vormen, in plaats van de wortel te verlaten. Het feit dat maar weinig juvenielen de wortel verlaten is vermoedelijk een aanpassing aan de overleving in *flooded* rijst. Immers, een juveniel kan geen wortels binnendringen in een overstroomde bodem. Hij kan er wel gedurende 27 dagen overleven en alsnog een plant infecteren wanneer binnen deze periode de bodem wordt gedraineerd [4, 18].

2.2.3.3 Inductie van reuzencellen

Nadat de reserves in de darm zijn opgebruikt moet de wortelknobbelnematode beroep doen op de plant voor voedsel. Deze ontwikkelt *reuzencellen*, dit zijn sterk morfologisch en fysiologisch veranderde cellen die als voedingsplaatsen voor de wortelknobbelnematoden fungeren. Ze bevinden zich in het floëem of in het aangrenzende parenchym. Ze ontstaan doordat de reuzencellen verscheidene mitoses ondergaan, zonder de bijhorende cytokineses. Reuzencellen zijn met andere woorden het product van herhaalde acytokinetische mitose. Ze kunnen meer dan 100 kernen bevatten [11, 19]. Deze reuzencellen zijn onmisbaar voor de overleving van de nematode, ze zijn verantwoordelijk voor de voedselvoorziening van alle sessiele stadia. Het opnemen van voedsel gebeurt via het stylet (zie sectie 2.4.2). De reuzencel moet meer dan een maand functioneel blijven [19]. Ontwikkelt de plant deze reuzencellen niet, dan sterft de nematode door gebrek

aan voedsel, of, indien hij nog voldoende voedselreserves over heeft, migreert hij terug uit de wortel om een andere wortel te infecteren [11]. De reuzencellen leveren energie voor verschillende vervellingen en voor het produceren van eitjes. Naarmate de nematode meer voedingsstoffen verbruikt om meer en meer eitjes te kunnen produceren, moeten de reuzencellen metabolisch actiever worden. Om voldoende voedsel te kunnen aanleveren vergroot de DNA-inhoud: er zijn aneuploïde kernen aanwezig, d.i. kernen met 14 tot 16 keer meer DNA dan een normale kern [11]. De inductie van deze reuzencellen staat onder controle van de nematode, dit gebeurt meer bepaald onder invloed van eiwitten aangemaakt in de faryngeale klieren en gesecreteerd via het stylet, de zogenaamde effectors (zie sectie 2.4.3). Het is mogelijk dat meerdere cellen tegelijk gestimuleerd worden om zich om te vormen tot reuzencel [19].

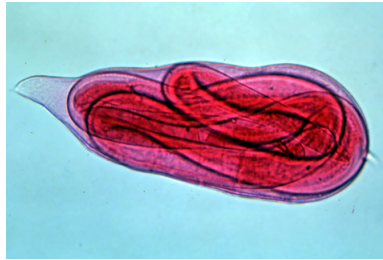
2.2.3.4 Galvorming

Hoewel de reuzencellen zich er wel in bevinden, zijn de gallen die macroscopisch zichtbaar zijn op het oppervlak van geïnfecteerde wortels niet het gevolg van de aanwezigheid van reuzencellen, maar wel van de ongeveer gelijktijdig optredende hyperplasie en hypertrofie van omliggende cellen [11, 17]. De grootte van de gallen is afhankelijk van de plant, het soort nematode en het aantal nematoden. De gallen zijn, in tegenstelling tot de reuzencellen, niet noodzakelijk voor het overleven van de nematode. Met het ontstaan van beide fenomenen gaan wel grotere hormonenconcentraties gepaard. Zowel auxines als cytokines zouden een rol spelen. Ethyleen zou betrokken zijn bij het induceren van hypertrofie van de parenchymcellen in de cortex [11].

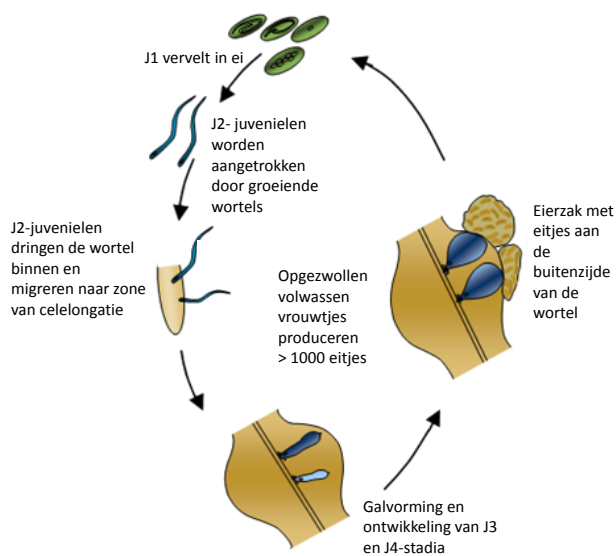
2.2.3.5 Ontwikkeling tot adult via J3- en J4-stadium

Eenmaal de reuzencellen zijn gevormd, ondergaat de J2-nematode verschillende morfologische veranderingen. Hij groeit een beetje in lengte en de faryngeale klieren vergroten. Onder nog een aantal veranderingen is de ontwikkeling van de geslachtsorganen uitgaande van de genitale primordia het belangrijkste. Vervolgens ondergaan de nematoden drie vervellingen, waarvan de derde het meest ingrijpend is voor de mannetjes. Adulte mannetjes nemen een draadvorm aan en blijven opgerold in de cuticula van het vierde juveniel stadium zitten (Figuur 2.3). De vrouwtjes daarentegen behouden hun vorm min of meer zoals die was tijdens de juveniele stadia, maar nemen, eenmaal volwassen, geleidelijk een peervorm aan. De energie nodig voor de laatste twee vervellingen moet reeds tijdens het J2-stadium opgeslagen worden. Immers, in het derde en vierde juveniel stadium is er geen stylet aanwezig en is er dus ook geen mogelijkheid tot voeden. Het stylet verschijnt opnieuw in het adulte stadium [11]. De vrouwtjes van de meeste wortelknobbelnematoden eindigen hun levenscyclus dus op het oppervlak van de wortel, waar ze ook de eierzak met de eitjes produceren. De mannetjes zijn mobiel en verlaten de wortel, waarna ze de eitjes aan het oppervlak bevruchten in geval van amfimictische soorten (zie ook 2.2.4). Zoals reeds vermeld is *Meloidogyne graminicola* een uitzondering: de vrouwtjes blijven in het wortelweefsel in plaats van op het oppervlak aanwezig te zijn. Bijgevolg blijven ook de eimassa's intern in de wortel zitten [4, 18].

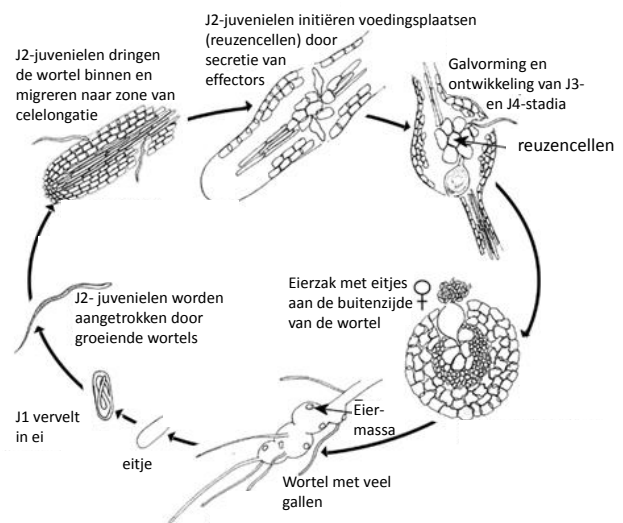
Een volledige levenscyclus van een wortelknobbelnematode duurt gemiddeld één tot twee maanden [17], maar wordt door *Meloidogyne graminicola* al in 19 dagen voltooid bij een temperatuur tussen 22°C en 29°C [4, 18]. De levenscyclus wordt schematisch weergegeven in figuren 2.4 en 2.5.



Figuur 2.3: Volwassen mannelijke wortelknobbelnematode die zich nog steeds in de cuticula (rood door kleuring) van de juveniele stadia bevindt [20]



Figuur 2.4: Schematische voorstelling van de levenscyclus van *Meloidogyne* [20, 21]

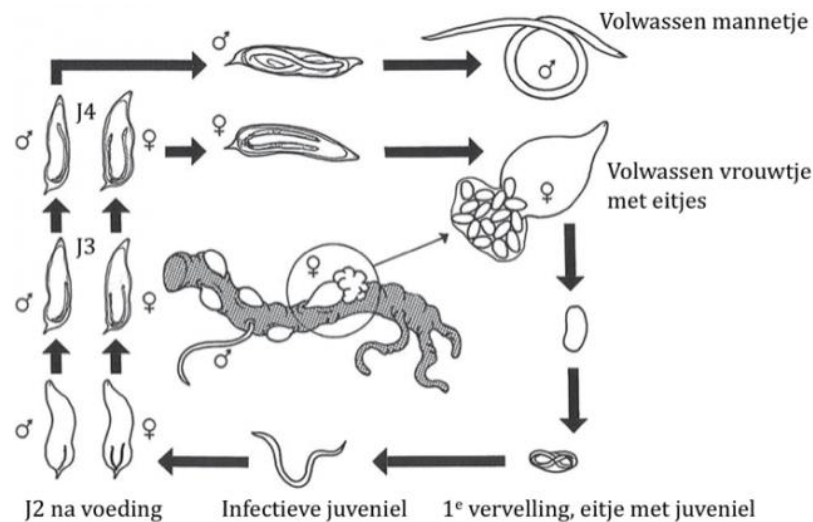


Figuur 2.5: Schematische voorstelling van de levenscyclus van *Meloidogyne* [20]

2.2.4 Reproductie

Meloidogyne graminicola is een facultatief meiotisch parthenogeen (automicisch). Dit houdt in dat de oöcyt de eerste meiotische deling ondergaat, maar dat er niet noodzakelijk een bevruchting moet volgen. Indien er mannetjes in de buurt zijn, treedt de bevruchting op zoals in amfimictische species: de haploïde spermacel versmelt met de haploïde eicel tot een diploïde zygote. Is er echter geen sperma aanwezig, dan versmelt de haploïde eicel met een haploïd poollichaampje. Het verschil met soorten waar de meiose niet doorgaat is dat er toch enige vorm van genetische reorganisatie doorgaat, nl. tijdens de *crossing-over*. De mannetjes paren nadat ze vrijkomen uit de laatste juveniele cuticula. De vrouwtjes secreteren een gelatineuze substantie waarin ze eitjes uitscheiden (Figuur 2.6). Het aantal varieert naargelang de gastheerplant en de omstandigheden (o.a. voedselbeschikbaarheid), maar kan tot 80 eitjes per dag zijn. Meestal bevindt deze gelatineuze matrix zich op het oppervlak van de wortel, waar de buitenste lagen hard worden (Figuur 2.2), maar niet in het geval van *Meloidogyne graminicola*, daar wordt de eimassa binnenin het wortelweefsel gelegd en verlaten de juvenielen ook vaak de wortel niet. Het vocht beschermt de eitjes tegen uitdroging, waardoor ze ruime tijd kunnen overleven in de bodem [11].

Het aantal mannetjes is in parthenogene populaties, zoals die van *Meloidogyne graminicola*, afhankelijk van de omgevingsomstandigheden en de geïnfecteerde plantensoort. Wanneer er weinig voedsel voorra-

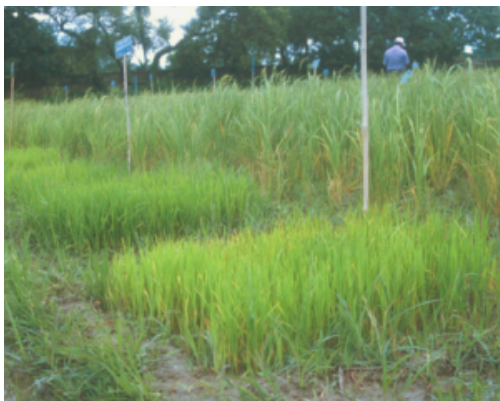


Figuur 2.6: Schematische voorstelling van de levenscyclus van *Meloidogyne* [11, 12]

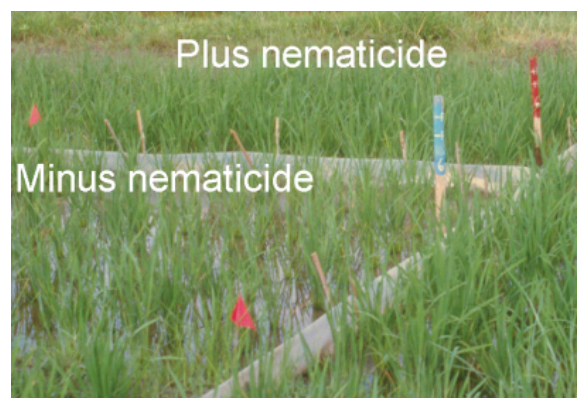
dig is, zijn er meer mannetjes - en kunnen juveniele vrouwtjes zelfs evolueren tot adulte mannetjes - daar amphimixis zorgt voor meer genetische variatie en dus meer kans op overleven tijdens voedselschaarste. In gunstige omstandigheden zijn mannetjes zeldzaam of afwezig [11].

2.2.5 Schadebeeld en economisch belang

Gezien de endoparasitaire manier van leven, richt het geslacht *Meloidogyne* veel economische schade aan (Figuren 2.7 en 2.8). De sterkst verspreide soorten binnen dit geslacht zijn *M. incognita*, *M. javanica* en *M. arenaria*. Allen hebben ze onder andere rijst als gastheer. Rijst is tevens de belangrijkste gastheerplant voor *M. graminicola*, die voorkomt in alle belangrijke rijsttelende gebieden wereldwijd, maar voornamelijk sterk vertegenwoordigd is in Zuid- en Zuidoost Azië [4]. Verder kunnen ook andere teelten door deze nematode worden geïnfecteerd, zoals ajuin, maïs, tarwe, erwten, biet, sojaboon en tuinboon.



Figuur 2.7: Groei van rijst-zaailingen in met *Meloidogyne graminicola* besmette grond in Bangladesh. Het perceel links werd behandeld met furadan 5G om de nematoden te bestrijden; het perceel rechts werd niet behandeld [22]



Figuur 2.8: Groei van rijst-zaailingen in met *Meloidogyne graminicola* besmette grond in Bangladesh [22]

Het voornaamste symptoom van een *Meloidogyne graminicola* infectie is uiteraard de galvorming. Op de wortels van geïnfecteerde planten zijn duidelijk macroscopische verdikkingen aanwezig (Figuren 2.9 en 2.10) [17]. Een specifiek kenmerk voor *Meloidogyne graminicola* is het feit dat er veel gallen aanwezig zijn op de worteltoppen en dat deze meestal gekromd zijn [4].



Figuur 2.9: Microscopisch beeld van een gal op fuchsine-gekleurde wortels van *Nipponbare*-rijst geïnfecteerd met *Meloidogyne graminicola*



Figuur 2.10: Microscopisch beeld van een gal op fuchsine-gekleurde wortels van *Nipponbare*-rijst geïnfecteerd met *Meloidogyne graminicola*

De nematoden verhinderen niet alleen de vlotte doorstroom van water en nutriënten naar de bovengrondse plantendelen, ze inhiberen ook de wortelgroei en -vertakking, waardoor het oppervlak beschikbaar voor nutriëntopname geringer is en nutriënten en voornamelijk water vaker buiten het bereik van de plant liggen [11]. Net als bij andere aantastingen van het wortelsysteem geeft dit aanleiding tot bovengrondse symptomen als dwerggroei, blijf van nutriëntentekort, tijdelijke verwelking 's middags of bij lichte waterstress, chlorose en ten gevolge van dit alles een verminderde opbrengst. Naast het gereduceerde wortelstelsel is het feit dat fotosyntheseproducten worden afgestaan aan de nematoden ook in belangrijke mate verantwoordelijk voor een verminderde opbrengst. Via de reuzencellen (zie sectie 2.2.3) worden voedingsstoffen aan de plant onttrokken om de J2- en adulte nematoden te voeden [11]. In *flooded* rijst kan de infectie ervoor zorgen dat de plant niet boven het waterniveau uitgroeit [4, 11, 17].

Deze *flooded* rijstvelden worden het zwaarst getroffen [17]. 4000 juvenielen van *Meloidogyne graminicola* per plant zorgen er volgens experimenten voor een opbrengstverlies van 72%. In *upland* rijst bedraagt de opbrengstvermindering ongeveer 2,6% per 1000 nematoden per zaailing. Om een verlies van 10% te bekomen zijn er respectievelijk 120, 250 en 600 eitjes per plant nodig voor planten die 10, 30 en 60 dagen oud zijn [18, 23].

2.2.6 Overleving in de bodem

Meloidogyne-species zijn het meest actief wanneer het vochtgehalte in de bodem 40 tot 60 procent van de veldcapaciteit bedraagt [1, 17]. Vooral in zandgronden richten ze veel schade aan. Hier zijn de poriën namelijk voldoende groot om een vlotte verplaatsing toe te laten [1]. Dit type grond droogt relatief snel uit, maar de gelatineuze matrix rond de eitjes beschermt hen tegen vochtverlies [11]. De pH van de bodem kan een invloed hebben op het overleven van de nematoden, temperatuur daarentegen is geen belangrijke factor

[1]. Eitjes en juvenielen kunnen lange tijd overleven in waterverzadigde bodems, hun aantallen verminderen sterk na vier maanden, maar sommige eitjes overleven tot 14 maand. Ook in onder water staande bodems kunnen juvenielen tot 5 maanden overleven. Onder deze omstandigheden is echter geen infectie mogelijk, maar dit gebeurt wel van zodra de bodem wordt gedraineerd [17]. Op die manier is het continu overstroomd houden van de velden ook een mogelijke bestrijdingsmaatregel, evenals het opkweken van de zaailingen in onder water staande grond [23]. Er dient opgemerkt te worden dat de eitjes bij *M. graminicola* vaak in de wortel worden gelegd en dat de juvenielen ook veel minder vaak de wortel verlaten (zie ook sectie 2.2.3.2).

2.2.7 Bestrijding

Preventie van *Meloidogyne*-infecties is mogelijk door zich ervan te verzekeren dat het pootgoed vrij is van nematoden en door de landbouwwerktuigen vrij te maken van gecontamineerde aarde voor er opnieuw mee te werken [11]. Vaak kan infectie echter niet op deze manier tegengehouden worden; om dan de kwantiteit en kwaliteit van de oogst te vrijwaren, is het noodzakelijk enkele bestrijdingsmaatregelen te nemen.

2.2.7.1 Vruchtwisseling

Een geschikte rotatie van verschillende gewassen kan effectief zijn in het controleren en terugdringen van de *Meloidogyne*-populatie. Wanneer een besmette bodem beplant wordt met een niet-gastheergewas voor een bepaalde nematode, dan zal die populatie sterk verzwakt worden door gebrek aan voedsel [11]. Vermits nematoden niet mobiel genoeg zijn om zich te verplaatsen naar velden waar wel een gastheerplant wordt geteeld, zal een groot deel van de nematoden afsterven.

Men kan ook gebruik maken van resistente planten in de rotatie om de populatie nematoden terug te dringen, *Oryza longistaminata* en *O. glaberrima* zijn voorbeelden van resistente rijstsoorten [11, 17, 23].

2.2.7.2 Fysische controlemaatregelen

Afhankelijk van de omstandigheden en het species worden fysische methoden met wisselend succes toegepast. Mogelijke maatregelen zijn: vernietigen van al het achtergebleven wortelmateriaal na de oogst op het veld, meer organisch materiaal in de bodem brengen, de bodem enkele maanden onder water zetten om infectie van de ondertussen groeiende planten te verhinderen, ploegen tijdens het droge seizoen om de nematoden uit te drogen, stomen, bevriezen, solarisatie, ... [11, 18, 23].

2.2.7.3 Biologische controlemaatregelen

Er zijn nog geen natuurlijke vijanden van *Meloidogyne*-species die op grote schaal als antagonist worden gebruikt in de bestrijding. Er zijn wel al stammen van de schimmel *Paecilomyces lilacinus* ontwikkeld voor deze doeleinden. Ook *Pochonia chlamydosporia* kan deel uitmaken van de geïntegreerde gewasbescherming als biologisch controleagens tegen *Meloidogyne* [11].

2.2.7.4 Chemische controlemaatregelen

Nematiciden zijn zeer effectief in het bestrijden van *Meloidogyne*. Zaden kunnen behandeld worden met bijvoorbeeld carbofuran. De wortels van zaailingen kunnen behandeld worden met systemische middelen

zoals oxamyl of fensulfothion [17]. Voor de planten op het veld staan, kan men de nematoden aanwezig in de bodem afdoden m.b.v. fumigatie [11].

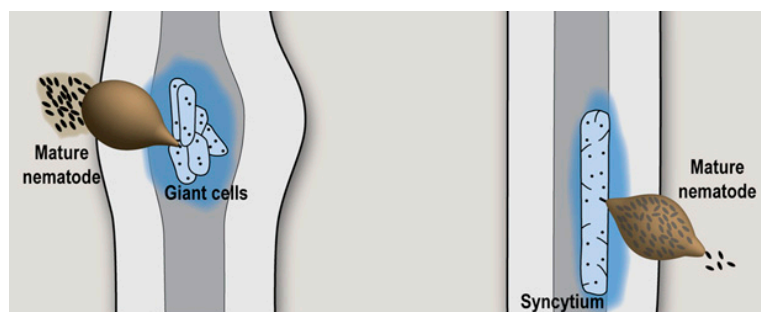
Vermits rijst vaak vele jaren na elkaar op hetzelfde veld wordt geteeld en chemische middelen veruit de meest effectieve en snelle bestrijding leveren, wordt er momenteel sterk op nematiciden gerekend om een infectie terug te dringen.

2.3 Andere economisch belangrijke nematoden

2.3.1 Cystnematoden

Samen met de wortelknobbelnematoden zijn de cystnematoden op economisch vlak de belangrijkste groep nematoden. Ze zorgen eveneens wereldwijd voor zware verliezen in teelten als rijst, sojabonen, tarwe en aardappelen. De meest schadelijke species behoren tot de genera *Globodera* (bijvoorbeeld *G. rostochiensis* met als gastheerplanten tomaat, aardappel en aubergine) en *Heterodera* (bijvoorbeeld *H. schachtii* met als gastheerplanten onder andere veel soorten kolen of *H. oryzae* die rijst infecteert) [18, 24]. De verliezen in bijvoorbeeld aardappelopbrengst worden voor Europa geschat op negen procent [24].

Wortelknobbelnematoden verschillen van de cystnematoden in twee aspecten. De eerste migreren doorheen de wortel via de apoplast, waar de andere zich intracellulair voortbewegen. Het tweede grote verschil betreft de manier waarop de voedingsplaatsen worden aangelegd. Cystnematoden zorgen voor de afbraak van de celwanden tussen aangrenzende wortelcellen, waardoor na protoplastfusie een syncytium ontstaat. De voedingsplaats vindt dus zijn oorsprong in meerdere gastheercellen [25]. Wortelknobbelnematoden vormen een zogenaamde reuzencel uitgaande van één enkele gastheercel. Ze induceren er kerndeling zonder cytokinese, waardoor eveneens een meerkernige cel wordt gevormd. De verschillen worden voorgesteld in figuur 2.11.



Figuur 2.11: Schematische voorstelling van de interactie tussen een plant en wortelknobbelnematoden (links) of cystnematoden (rechts). Wortelknobbelnematoden induceren verschillende reuzencellen in het vaatweefsel (links). Cystnematoden vormen een syncytium in de pericyclus of het procambium (rechts) [26].

2.3.2 Migratorische endoparasitaire nematoden

In tegenstelling tot de sedentaire nematoden (wortelknobbelnematoden en cystnematoden) vormen de migratorische nematoden geen voedingsplaats in de plant. Terwijl ze zich voeden en voortplanten, migreren ze inter- of intracellulair doorheen de plant. Economisch belangrijke soorten zijn *Pratylenchus*, *Radopholus*, *Hirschmanniella*, *Ditylenchus* en *Aphelenchoides*. De eerste drie infecteren wortels, de laatste twee parasiteren

de bovengrondse delen van planten, wat hen uniek maakt onder de nematoden [27]. Op rijst parasiteren bijvoorbeeld *Hirschmanniella oryzae* en *Ditylenchus angustus* [18].

2.3.3 Ectoparasitaire nematoden

Ectoparasitaire nematoden dringen het wortelweefsel niet binnen. Om zich te voeden beschikken ze over een extra lange stylet om de wortelcellen van buitenaf aan te prikken. Zo veroorzaken ze mechanisch schade, maar daarnaast brengen sommige ectoparasitaire nematoden ook virussen over van plant naar plant. Enkele voorbeelden van ectoparasitaire nematoden zijn *Helicotylenchus* en *Dolichodorus* [24, 28]. In rijst komt *Xiphinema ifacolum* voor [18].

2.4 Moleculaire plant-nematode interacties

2.4.1 Zigzag-model

De sedentaire, endoparasitaire levensstijl van *Meloidogyne* vraagt om een langdurige, stabiele en innige interactie met de plant. In deze sectie wordt besproken hoe de plant zich verdedigt tegen parasieten en hoe de nematoden zich desondanks kunnen handhaven in hun gastheer.

2.4.1.1 Pathogen triggered immunity (PTI)

De plant schermt zich af van zijn omgeving met zijn stevige celwanden. Plantenparasitaire nematoden zijn echter in staat deze eerste barrière te doorbreken (zie sectie 2.2.3). Op dat moment schakelt de plant de eerste verdedigingslinie in, die houdt onder andere de productie van reactieve zuurstof species (ROS) in en de versteviging van de celwanden. De plant tracht dus de pathogeen te doden, maar tegelijkertijd wordt de pathogeen ingesloten zodat hij geen andere plantendelen kan infecteren [29]. Om dit te kunnen doen is het in de eerste plaats van belang de aanwezigheid van parasieten te detecteren. De plant moet dus registreren wanneer een nematode is binnengedrongen in zijn wortels. In het geval van microbiële parasieten, worden de factoren die verantwoordelijk zijn voor deze herkenning benoemd als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP's). Dit zijn sterk geconserveerde moleculen op basis waarvan de plant een pathogeen herkent. Bij detectie van deze PAMP's schakelt de plant zijn verdediging in, waardoor hij immuun wordt voor de pathogeen. Deze vorm van immuniteit wordt uitgelokt door de PAMP's en wordt dan ook benoemd als *pathogen triggered immunity* (PTI) (Figuur 2.12). Voor nematoden zijn tot nog toe geen moleculen geïdentificeerd die als PAMP zouden kunnen fungeren. Echter, gezien de symptomen bij nematode-infectie overeenkomen met deze geobserveerd bij PTI, kan men aannemen dat bepaalde secreties dienst doen als nematode-PAMP [14, 29, 30].

2.4.1.2 Effector triggered susceptibility (ETS)

Aangezien nematoden toch in staat zijn planten succesvol te infecteren, slagen zij erin om de PTI te doorbreken. Dit doen ze m.b.v. hun effectors, dit zijn eiwitten die door de nematode in het plantenweefsel worden geïnjecteerd en die absoluut noodzakelijk zijn om de infectie te doen slagen. Zij zijn onder andere cruciaal voor het aanmaken van een voedingsplaats, maar dus ook voor het onderdrukken van de verdedigingsacties

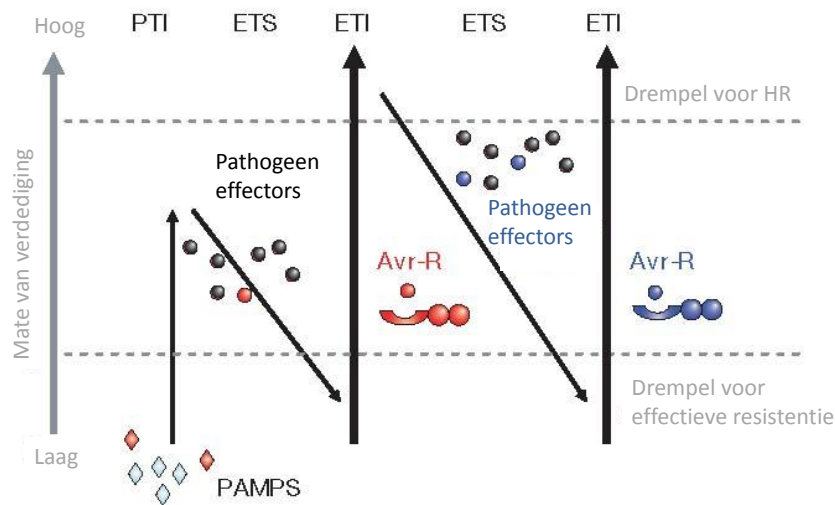
van de plant die anders zouden leiden tot PTI (zie sectie 2.4.3). Slaagt de nematode erin om m.b.v. zijn effectors deze verdediging inderdaad te onderdrukken, dan is er een succesvolle infectie. De plant is niet langer immuun, maar opnieuw gevoelig en wel ten gevolge van de actie van de effectors. Dit wordt dan ook benoemd als ETS of *effector triggered susceptibility* (Figuur 2.12) [14, 30]. De genen die coderen voor effectors worden ook wel avirulentiegenen (Avr-genen) genoemd.

2.4.1.3 *Effector triggered immunity (ETI)*

De plant op zijn beurt heeft in de loop van de evolutie geleerd sommige van deze individuele effectors (*gene-for-gene* model) of hun effect op de plant zelf (*guard cell* hypothese) te herkennen. Zo kan de plant zich opnieuw verdedigen en opnieuw immuun worden. Dit gebeurt vaak via een hypersensitieve respons (HR), wat inhoudt dat zeer lokaal het plantenweefsel wordt afgedood, waardoor ook de pathogeen die zich daar bevindt, sterft (Figuur 2.12) [29]. Hoewel de nematode dus enerzijds volledig steunt op effectors om een infectie te bewerkstelligen, zijn het anderzijds net deze moleculen die de plant aanzetten tot het activeren van verdedigingsmechanismen. Naar analogie met PTI wordt deze vorm van immuniteit de *effector triggered immunity* (ETI) genoemd (Figuur 2.12). De genen die verantwoordelijk zijn voor het herkennen en uitschakelen van microbiële effectors worden resistentiegenen (R-genen) genoemd. Voorbeelden van effectors die aanleiding geven tot ETI zijn MAP-1 uit *Meloidogyne incognita* en de Cg1-effector uit *Meloidogyne javanica*. Deze effectors wekken de verdedigingsmechanismen op in gastheerplanten die het *Mi-1* resistentiegen bevatten [31, 32].

2.4.1.4 *Zigzag-model*

Opnieuw is het aan de pathogeen om te trachten deze immuniteit te doorbreken. Dit kan door nieuwe effectors te ontwikkelen die nog niet door de plant herkend worden of door de reeds herkende effectors (deze waarvoor er R-genen in de plant aanwezig zijn) aan te passen zodat ze niet langer herkend worden. Wanneer door deze mechanismen de pathogeen er opnieuw in slaagt te infecteren, spreekt men opnieuw van ETS. De evolutie zet zich zo verder, waarbij de plant steeds nieuwe R-genen ontwikkelt om de steeds nieuwe effectors te herkennen en waarbij de nematode op zijn beurt steeds nieuwe effectors ontwikkelt om de nieuwe R-genen het hoofd te bieden. Deze constante evolutionaire wisselwerking, startend bij PTI en oneindig doorlopend met afwisselend ETS en ETI, wordt voorgesteld als het zigzag-model (Figuur 2.12) [30]. Dit model werd oorspronkelijk beschreven voor microbiële pathogenen, maar de nieuwe informatie die momenteel beschikbaar wordt omtrent nematode-effectors geeft ons meer en meer inzicht in deze interactie tussen plant en nematode [14].



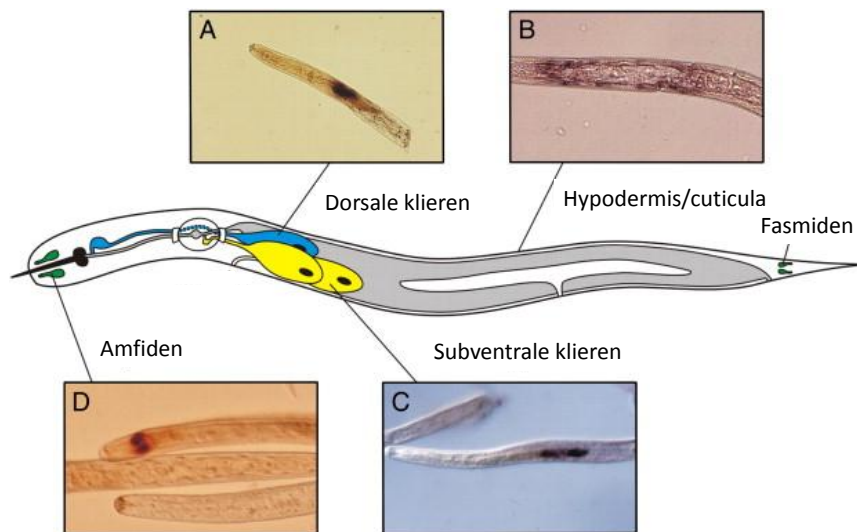
Figuur 2.12: Schematische voorstelling van het zigzag-model [30]

2.4.2 Aflevering van effectors in het plantenweefsel

Zoals beschreven in sectie 2.4.1, secreteren sedentaire plantenparasitaire nematoden effectoreiwitten in de gastheer. De definitie van "effectors" luidt "alle eiwitten en kleine moleculen geproduceerd door pathogenen en schadelijke dieren die de structuur en functie van de gastheercel veranderen ongeacht het feit of deze veranderingen de infectie vergemakkelijken of een afweerrespons opwekken bij de gastheer" [2].

Effectors kunnen geproduceerd worden in de faryngeale klieren en vervolgens gesecreteerd door het stylet, zoals reeds vermeld in sectie 2.2.2, maar daarnaast kunnen ze ook geproduceerd worden in de amfiden, fasmiden of de hypodermis. Eiwitten geproduceerd in de hypodermis komen op de cuticula terecht, d.i. de oppervlaktelaag van de nematode die bestaat uit eiwitten, koolhydraten en lipiden [33]. Daarnaast kunnen ook de amfiden en de fasmiden eiwitten secreteren. Amfiden zijn gelegen vooraan in het lichaam van de nematode, fasmiden zijn achteraan gesitueerd (Figuur 2.13). Amfiden hebben een functie in chemoreceptie, ze helpen de nematode om wortels te lokaliseren. Deze klieren staan in rechtstreeks contact met de buitenwereld, dus alle eiwitten die hier geproduceerd worden, worden rechtstreeks waargenomen door de plant [29].

De secretie van effectors afkomstig van de faryngeale klieren vereist naar alle waarschijnlijkheid een N-terminaal signaalpeptide dat bij het binnenkomen van het endoplasmatisch reticulum wordt afgeknipt, waardoor de effector zijn mature configuratie aanneemt. Vervolgens worden deze effectors via het stylet in de gastheer gebracht. Men kan zich dan de vraag stellen of het stylet de effectors aflevert in de apoplast of in het cytoplasma van de plantencel. Het doorboren van de plasmamembraan zou namelijk een destructief effect kunnen hebben op de integriteit van de reuzencellen, die net van groot belang is voor het overleven van de nematode. Het is geweten dat er een rechtstreekse verbinding is tussen het plantencytoplasma en de nematode, aangezien fluorescente moleculen uit het cytoplasma ook in het spijsverteringsstelsel van de nematode terug te vinden zijn [34, 35]. Echter, van bepaalde effectors is het geweten dat ze in de apoplast worden afgeleverd. Deze beide bevindingen worden verenigd in het concept van de *feeding tube* of voedselbuis. Deze voedselbuis wordt opgebouwd uit gesecreteerde proteïnen van de nematode. Deze bouwstenen vallen ook onder de definitie van een effector. De voedselbuis is een uniek concept dat voorlopig enkel be-



Figuur 2.13: Schematische voorstelling van een typische plantenparasitaire nematode met aanduiding van de belangrijkste secretorische organen, met foto's van orgaan-specifieke in-situhybridisaties. (A) SPRYSEC in *Globodera pallida* (B) SXP-RAL2 eiwit in *Globodera rostochiensis* (C) SXP-RAL2 eiwit in *Globodera rostochiensis* (D) chorismaatmutase in *Globodera pallida* [29]

kend is bij sedentaire plantenparasitaire nematoden. Door het gebruik van een dergelijke voedselbuis wordt enerzijds de integriteit van de reuzencellen bewaard - het is de voedselbuis en niet de bredere stylet die de plasmamembraan doorboort - en anderzijds wordt de inhoud van het cytoplasma gefilterd zodat enkel kleine moleculen (maximaal 40 kDa) worden opgenomen via het stylet. Sommige effectors worden in de apoplast afgeleverd, bijvoorbeeld de celwandafbrekende eiwitten, maar sommige worden ook via de voedselbuis in het cytoplasma gebracht. Zowel secretie als opname van moleculen gebeurt via het stylet, toch is dit gewoon een holle buis zonder verschillende kanalen. Dit houdt in dat secretie en opname gescheiden in de tijd moeten gebeuren. Eerst is er een fase van secretie, onder andere de bouwstenen voor de voedselbuis worden dan gesecreteerd, vervolgens is er een fase van opname. Deze twee fasen wisselen elkaar af [36]. Na secretie in de gastheer worden de effectors getransloceerd naar de plaats waar ze hun eigenlijke functie zullen uitoefenen. Er zijn voorbeelden gekend van effectors die een nucleair lokalisatiesignaal (NLS) bezitten, maar evengoed worden vele effectors naar hun bestemming getransporteerd door interactie met plantenmoleculen [14, 36, 37]. Nucleaire lokalisatiesignalen geven aan dat het beïnvloeden van de plant-*pathways* ook op transcriptieel niveau kan gebeuren [38].

2.4.3 Effectorfuncties

Effectors zijn voor pathogenen cruciaal voor het bewerkstelligen van een succesvolle interactie, m.a.w. een infectie. Hieronder worden enkele functies besproken. Wellicht zullen er in de toekomst nog veel andere functies bekend worden.

2.4.3.1 Modificatie van de plantencelwand

De celwand is opgebouwd uit cellulose *gecrosslinked* met hemicelluloses (vb. xylaan), ingebed in een pectinematrix en een kleine hoeveelheid structurele eiwitten [39]. Zoals reeds vermeld in sectie 2.2.3, doorbreekt

het J2-stadium de celwand en migreert hij vervolgens doorheen de apoplast. Dit doet hij door met zijn stylet mechanisch beschadiging toe te brengen aan de celwanden en middenlamellen, maar ook via de secretie van een aantal celwandafbrekende eiwitten. Deze enzymen worden voornamelijk geproduceerd in de subventrale kliercellen. Het betreft een mengeling van cellulase, hemi-cellulase en pectinasen [36, 40]. Veel verschillende species bezitten cellulasen behorend tot de *glycosyl hydrolase familie 5* (GHF5), waartoe ook de eerst ontdekte effector behoort, nl. het beta-1,4-endoglucanase uit de cystnematoden *Globodera rostochiensis* en *Heterodera glycines* [29, 41]. Pectaat lyase is onder andere in *Meloidogyne* aanwezig en knipt de alfa-1,4-bindingen van het pectaat. Daarnaast is er in *Meloidogyne* ook een polygalacturonase gevonden dat de 1,4-alfa-galactosiduronische bindingen hydrolyseert [29]. Andere voorbeelden van celwandafbrekende enzymen die in wortelknobbelnematoden in het algemeen worden aangetroffen zijn xylanasen, arabinogalactan endo-1,4-betagalactosidase en arabinase [29]. Naast enzymen worden er ook eiwitten gesecreteerd die celwandcomponenten binden om hun afbraak te vergemakkelijken (bijvoorbeeld cellulose-bindende eiwitten en expansinen) [40, 42, 43]. De rol van de cellulosebindende eiwitten is nog niet opgehelderd, maar men vermoedt dat het bindt op een pectinemethylesterase van de plant en zo dit enzyme actiever maakt [42]. Expansinen worden ook door de plant zelf geproduceerd en hebben als functie om de niet-covalente interacties tussen de polysaccharideketens te verzwakken om een gemakkelijke uitbreiding van de celwand mogelijk te maken [44]. Op die manier verschaffen ze echter ook de celwandafbrekende enzymen gemakkelijker toegang tot deze polymeren [29, 36].

Ook de kleine hoeveelheid eiwitten die in de celwand aanwezig is, kan door de nematoden worden afgebroken. Ze secreteren namelijk ook een gamma proteasen waarmee ze dus onder andere de structurele integriteit van de celwand verzwakken en hun migratie vergemakkelijken [29]. Daarnaast hebben ze ook een functie in de gedeeltelijke afbraak van voedingscomponenten, voor deze worden opgenomen en verteerd, en in afbraak van plantenafweerproteïnen [29].

2.4.3.2 Bescherming van de nematode

Endoparasieten wekken onvermijdelijk een immuunrespons op bij de gastheer (zie sectie 2.4.1). Om te kunnen overleven dienen nematoden zichzelf tegen deze afweer te beschermen.

Planten verdedigen zich tegen pathogenen via toxines (fytoalexines, isoflavonoïden of terpenoïden) en via ROS, wat leidt tot immuniteit, de zogenaamde PTI (zie sectie 2.4.1). Nematoden kunnen zich beschermen door deze te metaboliseren. De toxines worden mogelijk afgebroken door glutathione-S-transferasen (GST), een klasse van enzymen die door dierparasitaire nematoden worden gebruikt voor detoxificatie van verschillende componenten en die ook al in secreten van *M. incognita* werden teruggevonden. ROS zijn ook nadelig voor de nematode, niet alleen doordat ze de nematode rechtstreeks aanvallen, maar ook doordat ze effecten opwekken zoals versterking van de celwand en activatie van andere afweerstrategieën. Er zijn reeds verschillende voorbeelden gekend van antioxidanten die door nematoden worden geproduceerd om deze ROS te metaboliseren [29]. In *Meloidogyne graminicola* werd de aanmaak van superoxide dismutases aangetoond [45].

2.4.3.3 Onderdrukking van de afweer

Naast het overleven van de plantenafweerrespons, moeten sedentaire endoparasieten er ook voor zorgen dat het gastheerweefsel dat hen van voedsel voorziet intact blijft voor ongeveer zes weken, de tijd nodig voor de volledige ontwikkeling en voortplanting van de nematode [29]. Dit is mogelijk door de plantenafweer te onderdrukken.

Tot op heden is er weinig gekend over nematode-effectors die deze functie zouden hebben. Er zijn aanwijzingen dat chorismaatmutase, dat door onder andere enkele wortelknobbelnematoden wordt geproduceerd, plantenafweer onderdrukt. Chorismaatmutase zou ervoor zorgen dat minder chorismaat wordt omgezet naar siaalzuur, een molecule die afweer helpt opstarten. Deze hypothese dient echter nog experimenteel gevalideerd te worden [29, 36]. Ook het SPRYSEC-19 eiwit uit de aardappelcystnematode *Globodera rostochiensis* zou volgens recente experimenten plantenresistentie onderdrukken [46]. Andere eiwitten die mogelijk betrokken zijn bij het onderdrukken van de plantenafweer zijn deze die deel uitmaken van de ubiquitinylatie-*pathway*. In de cel worden eiwitten afgebroken en verwijderd na substitutie met ubiquitine-moleculen. Door enzymen uit deze ubiquitinylatie-*pathway* te secreteren in de plant kan de nematode afweermoleculen doen afbreken voor ze hun functie hebben kunnen uitoefenen [29]. Door middel van deze afweer-onderdrukkende effectors veroorzaakt de nematode ETS in de plant, de plant wordt met andere woorden weer gevoelig voor infectie (zie sectie 2.4.1). Recent werd ook nog aangetoond dat het calreticuline van *M. incognita* een belangrijke rol speelt in onderdrukking van de plantenafweer [47].

2.4.3.4 Verandering van de hormoonbalansen in de plant en beïnvloeding van de wortelontwikkeling

De veranderingen die optreden in de wortelontwikkeling na *Meloidogyne*-infectie (o.a. aanleggen van de reuzencellen en vorming van gallen) worden mede veroorzaakt door nematode-geïnduceerde veranderingen in auxineconcentratie [26]. Dit is niet verrassend, daar auxine een belangrijk plantenhormoon is dat bij organogenese in het algemeen betrokken is [48]. Dit gegeven wordt geïllustreerd door het feit dat auxine-mutanten significant minder gallen ontwikkelen [49]. Een voorbeeld van een effector die de auxinebalans verstoort, is chorismaatmutase. Overexpressie van dit enzyme in *hairy roots* van sojabonen veroorzaakte een sterke vermindering in aantal laterale wortels en zelfs het afsterven ervan, een fenotype typisch voor auxine-deficiëntie. Exogene toediening van indole-3-azijnzuur (IAA) neutraliseerde het effect van het chorismaatmutase, wat aangeeft dat dit enzyme verantwoordelijk is voor een verminderde IAA-biosynthese [50]. Het chorismaatmutase interfereert lokaal met de synthese van auxine, maar daarnaast zijn er ook mechanismen mogelijk waarin het aanwezige auxine ruimtelijk anders verdeeld wordt [29]. Dit gebeurt doordat nematoden de expressie van auxine-transportmoleculen beïnvloeden in tijd en plaats. Op die manier worden de auxineconcentraties opgedreven op het moment dat en op de plaats waar een reuzencel wordt gevormd. Een voorbeeld van een effector met dergelijke werking is 19C07 uit cystnematoden. In *Heterodera schachtii* zou dit eiwit interageren met de LAX3 auxine transporter (en de AUX1/LAX familie in het algemeen) [51].

16D10 is een *M. incognita*-effector die de wortelontwikkeling verandert en die tevens in staat is PTI te doorbreken (zie sectie 2.4.1). Deze effector interageert met *SCARECROW-like* transcriptiefactoren in tomaat, die het radiale patroon van de wortels reguleren [52, 53]. Bij overexpressie in *Arabidopsis* bleek deze effector wortelgroei met normale differentiatie te stimuleren [52]. Deze gegevens tonen aan dat 16D10 de wortelgroei beïnvloedt door interactie met transcriptiefactoren van de gastheer [14]. Rekening houdend

met zijn proliferatie-bevorderende werking zou 16D10 een rol kunnen spelen in de vorming van reuzencellen [52]. Het feit dat 16D10 essentieel is voor het infectieproces wordt aangetoond m.b.v. transgene *Arabidopsis* planten waarin dsRNA tot expressie gebracht wordt voor *silencing* van dit 16D10 gen. Deze transgene planten zijn resistent tegen de nematode, daar via *RNA interference* (RNAi) het cruciale 16D10 gen wordt uitgeschakeld [3]. 16D10 is slechts één voorbeeld van hoe parasitaire nematoden via effectors tussenkomen in de *pathways* van de plant.

De rol van de ethyleen-*pathway* in de afweer tegen een *Meloidogyne*-infectie is nog onduidelijk. Onderzoeksresultaten tonen bijvoorbeeld aan dat ethyleen-mutanten in dezelfde mate geïnfecteerd worden door *M. incognita* als de controlelijnen met actieve ethyleen-genen [54]. De ethyleenbiosynthese wordt in de reuzencellen neergereguleerd, waar deze voor auxine wordt opgereguleerd [55]. Ander onderzoek toont dat ethyleen via de jasmonaat-*pathway* betrokken is bij de verdediging tegen een *Meloidogyne graminicola* infectie. Er zijn echter nog geen effectors gekend die via de ethyleen-*pathway* ingrijpen in de plantenafweer.

2.4.3.5 Nabootsen van plantenspecifieke moleculen

Om te kunnen ingrijpen in de metabolische *pathways* van de gastheerplant secreteren nematoden o.a. effectors die plant-eigen moleculen nabootsen [19]. Voorbeelden hiervan zijn: chorismaatmutase, *expansine-like* eiwitten, *CLAVATA-3/ESR-like* eiwitten (CLE) en annexines [19]. Verder zijn er aanwijzingen, maar nog geen bewijs, voor productie van plantenhormonen door nematoden: cytokines die de celdeling stimuleren en aldus bijdragen tot syncytiumvorming en misschien ook auxines [29, 56, 57].

In het geval van chorismaatmutase staat het vast dat dit eiwit uitsluitend geproduceerd wordt om het plantenzym na te bootsen, het substraat voor dit enzym is namelijk niet in de nematode en ook niet in andere dieren aanwezig [50]. Via dit enzym kan de nematode ingrijpen in de shikimaat-*pathway* van de plant en op die manier auxine-, siaalzuur- en fytoalexineproductie controleren [19, 36].

Expansine-like eiwitten spelen een rol in het verzwakken van de plantencelwand [44].

DE CLE's zorgen dan weer voor het onderdrukken van celproliferatie, ten voordele van celdifferentiatie. Dit is nodig om reuzencellen te kunnen vormen. Het *M. incognita*-gen 16D10 is een voorbeeld van zo een gen in wortelknobbelnematoden waarvan het product gelijkenis vertoont met de CLE-moleculen in planten, het interageert met transcriptiefactoren uit de *SCARECROW-like* familie, zoals eerder vermeld [29]. Plantenannexines zijn betrokken bij abiotische stressresponsen [19].

2.5 Identificatie en functionele studie van effectormoleculen

2.5.1 Identificatie

Zoals eerder vermeld brengen nematoden effectormoleculen in de plant via het stylet, deze moleculen worden meestal geproduceerd in de faryngeale klieren. Een logische strategie voor het opsporen van effectormoleculen is dan ook zich te richten op eiwitten die in deze klieren geproduceerd worden. Tot op heden werd hiervoor voornamelijk microaspiratie van de inhoud van deze klieren toegepast [36].

Een techniek die wordt toegepast op de inhoud van de faryngeale klieren of op ander materiaal van gemengde of specifieke levensstadia van de nematoden is EST-analyse. *Expressed sequence tags* (ESTs)

zijn sequenties van mRNA-fragmenten die worden bekomen door het sequencen van willekeurig geselecteerde klonen uit een cDNA-bibliotheek [58]. Ze geven dus een onvolledig beeld van welke sequenties er tot expressie komen in een nematode. Nadien worden de bekomen mRNA-fragmenten getest m.b.v. in-situ hybridisatie om deze eiwitten te selecteren die in de faryngeale klieren worden geproduceerd, dit is namelijk een sterke indicatie voor een rol als effector [29, 59]. Deze werkwijze werd onder andere toegepast door *Gao et al.*: men creëerde een cDNA-bibliotheek door microaspiratie van het cytoplasma van de faryngeale klieren van *H. glycines*. De bekomen bibliotheek werd onderworpen aan EST-analyse en dat leverde, in combinatie met *high-throughput* in situ-expressie lokalisatie, een lijst van 51 potentiële effectors op, waarvan 38 tot dan toe ongekende sequenties [60]. Een gelijkaardige aanpak resulteerde in een cDNA-bibliotheek van de klieren van *M. incognita*. In-situ hybridisatie hier leverde een lijst van 37 genen op die tot expressie komen in de klieren [61]. Enkele interessante bevindingen omtrent de fylogenie van deze potentiële effectorgenen uit *H. glycines* en *M. incognita* zijn het feit dat meer dan 70% geen gelijkenis vertoonde met andere genen of gelijkenis vertoonde met prokaryotische genen, het feit dat er nauwelijks gelijkenis bestond tussen de potentiële effectors van *H. glycines* en *M. incognita*, wat suggereert dat cystnematoden en wortelknobbelnematoden andere moleculen aanwenden voor infectie, en het feit dat er zeer weinig homologen werden gevonden in het volledige genoom van de nematode *C. elegans*, wat een extra indicatie is dat de genen in kwestie wel degelijk aangewend worden voor parasitisme [36].

Door de komst van de *next generation sequencing* methodes, is het nu ook mogelijk om na isolatie van de faryngeale klieren en mRNA extractie de eiwitten die daar geproduceerd worden te sequencen [14]. Deze sequenties worden dan verder in silico geanalyseerd op zoek naar mogelijke effectors: men selecteert deze eiwitten die een signaalpeptide bezitten en geen transmembraandomein [36, 59]. Hoe meer sequentie-data voorhanden zijn in de toekomst, hoe meer potentiële effectors deze methode zal opleveren.

Naast de hierboven beschreven EST-data zullen in de toekomst ook volledige genoomsequenties voorhanden zijn. Een dergelijke uitgebreide dataset vraagt echter om gepaste bio-informatica technieken om er de gewenste informatie uit te bekomen. Voorlopig zijn van wortelknobbelnematoden de volledige genomen enkel gekend van *Meloidogyne incognita* en *Meloidogyne hapla* [40, 62].

Anderzijds werden ook proteoomstudies opgezet om de gesecreteerde eiwitten rechtstreeks te identificeren als potentiële effectormoleculen [29]. Bijvoorbeeld werden m.b.v. massaspectrometrie 486 eiwitten uit het secretoom van *M. incognita* geïdentificeerd. Vervolgens werd ook in deze studie in-situ hybridisatie toegepast die expressie in de faryngeale klieren, maar ook in de fasmiden aantoonde [63]. Ook werd een andere proteoom-benadering voorgesteld: enkel gesecreteerde proteïnen werden opgezuiverd en gescheiden in een 2-dimensionale elektroforese (eiwitten met een isoelektrisch punt tussen 5 en 7,5). De zeven meest abundante werden vervolgens gesequeneerd. Zo werd een calreticuline ontdekt bij *M. incognita* waarvoor men bovendien expressie in de subventrale faryngeale klieren kon aantonen [64].

2.5.2 Functionele studie

Een andere uitdaging is het bepalen van de functie van potentiële effectorgenen. Dit kan gedaan worden via RNAi. In deze experimenten worden de genen die coderen voor de te bestuderen effector uitgeschakeld. Uit het resulterende fenotype kan de functie van de effector soms worden afgeleid. In de meeste gevallen echter is het resultaat enkel een vermindering in virulentie, zonder dat zichtbaar is wat het onderliggende

mechanisme is, zoals in de studie van *Bakhetia et al.* [65]. RNAi kan bekomen worden door toediening van dsRNA aan de nematoden, bijvoorbeeld via een *surrounding soaking medium*.

Een andere methode om aanwijzingen voor functies te verzamelen is *yeast-2-hybrid*. Deze techniek leert met welke eiwitten de effector interageert. De functie van het 19C07 eiwit werd zo achterhaald. Men ontdekte dat het interageert met auxintransporters (zie sectie 2.4.3) [29, 51]. Ook het eiwit 10A06 uit *H. schachtii* werd via *yeast-2-hybrid* functioneel gekarakteriseerd: het bindt spermidinesynthase in de plantencel. Dit zou kunnen wijzen op een rol in verhoogde bescherming van de nematode via antioxidanten en het verstoren van de siaalzuursignalisatie-*pathway* van de plant [66].

Verder kan ook subcellulaire lokalisatie in het plantenweefsel waardevolle informatie opleveren voor het ophelderen van de functie van een effector [29].

Ook het transformeren van gastheerplanten met een nematode-gen kan informatie opleveren in verband met de functie van het gen in kwestie. Het fenotype dat de transgene plant vertoont en de verandering in zijn genexpressie kunnen indicaties opleveren [36]. Bijvoorbeeld werd *A. thaliana* getransformeerd met het wortelknobbelnematodegen 16D10, waarbij het fenotype versnelde wortelgroei vertoonde (zie sectie 2.4.3) [52]. Een andere toepassing van transgene planten is het tot expressie brengen van een dsRNA in de plant, met als bedoeling een gen van de nematode te *silencen* van zodra deze de plant infecteert (*host derived RNAi*). Er werd reeds verminderde infectie door *M. incognita* aangetoond ten gevolge van *host derived RNAi* [67]. Ook werd er een patent aangevraagd voor "cystnematode-resistente transgene planten" [68]. Verder werd *host derived RNAi* gebruikt om de rol van 16D10 in parasitisme van wortelknobbelnematoden aan te tonen, sterke resistentie werd bekomen tegen vier belangrijke *Meloidogyne* species (*M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* en *M. hapla*) [3].

Hoofdstuk 3

Materiaal en methoden

3.1 Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector

3.1.1 Vermenigvuldiging van de fragmenten

cDNA van J2-nematoden wordt gebruikt in PCR-reacties om de te ligeren genen te vermenigvuldigen.

Plaats bij het voorbereiden van een PCR (Eng.: *Polymerase Chain Reaction*) of polymerase ketting reactie alle producten steeds op ijs. Voeg volgende componenten samen (*mastermix*):

- 0,5 μ l cDNA
- 2 μ l 10x key buffer (VWR)
- 0,5 μ l dNTP's (5mM) (Invitrogen)
- 0,5 μ l *forward* primer (F-primer) (10 μ M)
- 0,5 μ l *reverse* primer (R-primer) (10 μ M)
- 15,9 μ l gedestilleerd water

Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,1 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l) (VWR) toe. Stel het PCR-toestel in op 35 maal volgende cyclus: 35 seconden bij 94°C (denaturatie) - 35 seconden bij 54°C (hybridisatie) - 60 seconden bij 72°C (elongatie).

Visualiseer de PCR-producten via elektroforese:

1. Maak een geloplossing van 1,5% agarose (6g agarose in 400 ml 0,5xTAE buffer (zie tabel A.1.4)).
2. Verwarm in de microgolf tot alles opgelost is.
3. Koel een beetje af en giet in een gelvorm met een plastic kam.
4. Leg de gestolde gel zonder de kam in het elektroforesetoestel.
5. Voeg laadkleurstof toe aan het PCR-product en laad 10 μ l staal in de openingen.
6. Laad in minstens 1 apart laantje de Massruler DNA ladder mix (Fermentas) ter indicatie van de grootte van de fragmenten.
7. Onderwerp de gel aan 20 minuten elektroforese bij 135V.
8. Plaats de gel in een ethidiumbromide-oplossing (1/10000 ethidiumbromide in 0,5xTAE-buffer (zie tabel A.1.4) bij kamertemperatuur voor ongeveer 15 minuten.
9. Bekijk de gel onder UV-licht met de Biorad Geldoc.

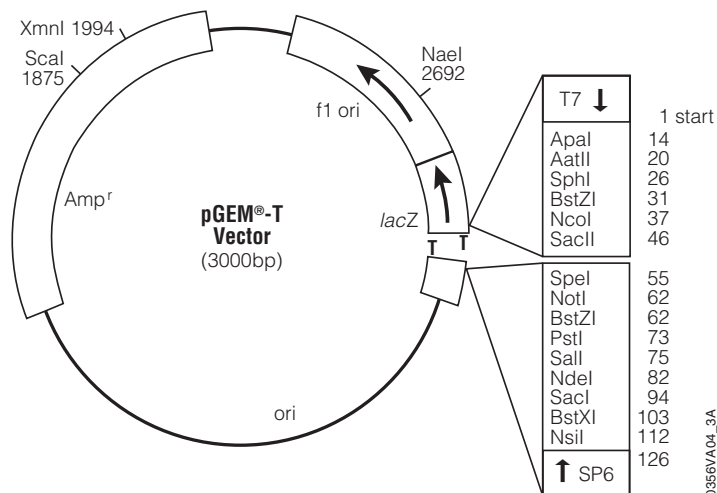
De primers worden gespecificeerd in sectie 4.1.

3.1.2 Ligatie in pGEM-T vector

Voeg volgende componenten samen:

- 1,5 μ l PCR product
- 2,5 μ l 2x ligatiebuffer (Promega)
- 0,5 μ l pGEM-T vector (Promega) (Figuur 3.1)
- 0,5 μ l ligase (Promega)

Incubeer minstens 16 uur bij 4°C.



Figuur 3.1: Vectormap van de pGEM-T vector [69]

3.1.3 Vermenigvuldiging van de vector in *E. coli*

1. Voeg 50 μ l hitteschok-competente *E. coli* cellen (reeds aanwezig in het labo) en 4 μ l ligatiemix samen en laat op ijs staan voor een half uur.
2. Houd 45 seconden in een warmwaterbad van 42°C.
3. Plaats op ijs voor 1 minuut.
4. Voeg het mengsel toe aan 1 ml SOC-medium (zie tabel A.2.1) en plaats het op de schouder bij 37°C voor 1 uur.
5. Voor blauw-witscreening: strijk 40 μ l van een 20 mg/ml stock X-gal opgelost in DMSO uit over de plaat.
6. Plaats 150 μ l uit op een LB-plaat (zie tabel A.1.3) met 100 μ g/ml carbenicilline en sluit de platen af met parafilm.
7. Laat de kolonies overnacht groeien bij 37°C.

Vervolgens worden de kolonies getest op aanwezigheid van het construct via kolonie-PCR:

1. Bereid voor elke te testen kolonie een PCR-buisje voor met 10 μ l gedestilleerd water.

2. Raak de kolonies aan met een tipje, strijk hiermee over een nieuwe plaat en plaats dan het tipje in een PCR-buisje met water.
3. Pipetteer op en neer in de PCR-buisjes.
4. Denatureer de stalen 10 minuten bij 94°C.
5. Voeg de PCR-mix toe:
 - 0,5 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
 - 14,9 μ l gedestilleerd water
 - 3 μ l 10x key buffer (VWR)
 - 0,5 μ l dNTP's (5 mM) (Invitrogen)
 - 0,5 μ l SP6-primer (10 μ M)
 - 0,5 μ l T7-primer (10 μ M)
6. Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,1 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l)(VWR) toe.
7. Gebruik het volgende PCR-programma: 35 seconden bij 94°C - 35 seconden bij 54°C - 1 minuut en 20 seconden bij 72°C.

Visualiseer de PCR-producten zoals beschreven in 3.1.1. De te verwachten fragmenten zijn 162 bp langer dan de fragmenten geamplificeerd in sectie 3.1.1. Dit komt doordat de primers op de vector gelegen zijn en in totaal 150 bp van de vector mee laten amplificeren met het insert. De primersequenties zijn TATTTAGGTGACACTATAG (SP6) en TAATACGACTCACTATAGGG (T7) (Figuur D.0.1).

3.1.4 Opzuiveren van de vectors uit *E. coli*

1. Groei een kolonie die het construct bevat overnacht op in 5 ml LB-medium (zie tabel A.1.3) met 100 μ g/ml carbinicilline.
2. Extraheer de plasmiden met behulp van de GeneJET* Plasmid Miniprep Kit (Fermentas - Thermo Scientific).

3.2 Lokalisatie van expressie

Lokalisatie van expressie wordt gedaan door middel van in-situ hybridisatie.

3.2.1 Gelabelde probes maken

1. Reactie 1: voeg volgende componenten samen:
 - 22,4 μ l gedestilleerd water
 - 3 μ l 10x PCR buffer (VWR)
 - 0,8 μ l 5 mM dNTP's (Invitrogen)
 - 0,8 μ l forward primer (10 μ M)
 - 0,8 μ l reverse primer (10 μ M)
 - 2 μ l 1/50 verdund plasmide met template

Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,1 μl Taq-polymerase (1u/ μl)(VWR) toe. Gebruik het volgende PCR-schema: 30 seconden bij 94°C - 30 seconden bij 54°C - 45 seconden bij 72°C; 30x. De genspecifieke primers zijn weergegeven in bijlage B en C. Voor UK67 werden de primers aangeduid met de letter 'a' gebruikt (bijlage B).

2. Reactie 2: voeg volgende componenten samen:

- 39,3 μl gedestilleerd water
- 5 μl 10x PCR buffer (VWR)
- 2 μl digoxigenine (DIG)-gelabelde dNTP's (Roche)
- 2 μl reverse primer (*antisense* probe) (of *forward* primer voor constructie van een negatieve controle)
- 1,5 μl template uit reactie 1

Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,2 μl Taq-polymerase (1u/ μl)(VWR) toe. Gebruik het volgende PCR-schema: 30 seconden bij 94°C - 30 seconden bij 50°C - 45 seconden bij 72°C; 40x.

3.2.2 Extractie van nematoden uit rijstwortels

1. Was de wortels van geïnfecteerde planten onder stromend water zonder de gallen te beschadigen. Verwijder zo veel mogelijk aarde.
2. Plaats papieren zakdoekjes op een zeef met openingen van 100 of 200 μm en maak ze nat.
3. Knip de wortels zeer fijn (stukjes van 1 mm), knip ook de gallen door. Plaats de geknipte wortels op de zeef met zakdoekjes. Let erop dat de zakdoekjes niet over de rand van de zeef hangen.
4. Plaats de zeef in een schaalje en vul dit met kraantjeswater tot de wortels het wateroppervlak raken.
5. Verzamel het water 48 uur later.
6. Concentreer de nematodensuspensie op door te centrifugeren bij maximaal 250g.

3.2.3 Fixatie van de nematoden

Deze handelingen dienen RNase-vrij te worden uitgevoerd.

1. Verzamel de nematoden in zo weinig mogelijk water door ze te laten bezinken en de bovenste lagen af te pipetteren.
2. Voeg M9-buffer toe tot een volume van 1 ml en voeg 1 ml 4% paraformaldehyde in M9-buffer (zie tabel A.3.2) toe aan de pellet.
3. Laat 15 tot 16 uur fixeren op een rotor bij 4°C.
4. Laat nog 4 uur extra fixeren bij kamertemperatuur.

3.2.4 Versnijden van de nematoden

1. Centrifugeer de nematoden af bij 5000g.
2. Los de pellet op in 500 μl M9-buffer.
3. Bekijk enkele druppels nematoden op een draagglas onder de microscoop.
4. Snij de nematoden met een scheermesje tot de meeste nematoden in twee gesneden zijn.
5. Breng de gesneden nematoden in een nieuw epje, reinig het draagglas met M9-buffer.

3.2.5 Permeabilisatie

1. Was de nematoden 3 maal met 2 ml M9-buffer (centrifugeer telkens 1 minuut bij 8500 g).
2. Maak 1 ml proteïnase K oplossing in M9-buffer van 1 mg/ml uitgaande van een 10 mg/ml stockoplossing en voeg dit toe aan de nematode pellet, opgelost in 1 ml M9-buffer.
3. Laat 25 minuten roteren bij kamertemperatuur.
4. Centrifugeer 1 minuut bij 14000g, verwijder het supernatans.
5. Was de pellet met 1 ml M9-buffer, centrifugeer 1 minuut bij 14000 g en verwijder het supernatans.
6. Bevestig de pellet op ijs van -80°C voor 15 minuten.
7. Los de pellet op in 1 ml koude ethanol en incubeer 30 seconden op ijs.
8. Centrifugeer 30 seconden bij 14000g, verwijder het supernatans.
9. Los de pellet op in 1 ml koude aceton en incubeer 1 minuut op ijs.
10. Centrifugeer 1 minuut bij 14000g, verwijder de aceton tot ongeveer 100 μl overblijft en voeg DEPC-water (zie tabel A.3.3) traag toe in druppels tot een volume van 200 μl .

3.2.6 Hybridisatie

1. Centrifugeer 1 minuut bij 5000g, verwijder het supernatans.
2. Voeg 500 μl hybridisatiebuffer (zie tabel A.3.4) toe, centrifugeer 1 minuut bij 5000g, verwijder supernatans.
3. Los de pellet op in 500 μl hybridisatiebuffer en pre-hybridiseer minstens 20 minuten bij 47°C .
4. Denatureer de probes door ze in kokend water te plaatsen voor 5 minuten, plaats nadien onmiddellijk op ijs.
5. Voeg indien nodig hybridisatiebuffer toe aan de nematoden en verdeel ze in de verschillende epjes met de probes (er moet in elk epje minstens 250 μl zitten).
6. Hybridiseer overnacht bij 47°C .

3.2.7 Wassen

1. Was 3 maal 15 minuten met 4xSSC (zie tabel A.3.5) bij hybridisatietemperatuur en centrifugeer telkens 50 seconden bij 5000g.
2. Was 3 maal 20 minuten met 0,1xSSC + 0,1% SDS bij hybridisatietemperatuur en centrifugeer telkens 50 seconden bij 5000g.

3.2.8 Kleuren

1. Was 1 minuut met *maleic acid* buffer (zie tabel A.3.6), centrifugeer 4 minuten bij 750g.
2. Incubeer een half uur in 1% blocking agent (Boehringer Mannheim) in *maleic acid* buffer.
3. Incubeer 2 uur in 1:1000 antidigoxigenine antilichaam gekoppeld met alkalisch fosfatase (Roche) in 1% Boehringer blocking agent in *maleic acid* buffer.
4. Was 3 maal 15 minuten met *maleic acid* buffer die 0,01% Tween-20 bevat, centrifugeer elke keer 4 minuten bij 750g.

5. Was kort in alkalisch fosfatase detectiebuffer (zie tabel A.3.7), centrifugeer 4 minuten bij 750g.
6. Kleur de nematoden overnacht in het donker bij kamertemperatuur in ongeveer 100 μ l kleuroplossing (zie tabel A.3.8).

3.2.9 Bekijken onder de microscoop

1. Neem het supernatans af en voeg 50 μ l water toe.
2. Bekijk de nematoden onder de microscoop.

3.3 Blasten van potentiële effectorgenen

Blast met als zoekterm de eiwitsequentie van elk gen. Deze eiwitsequentie wordt bekomen door de codons te vertalen in alle 6 *frames*. Het *frame* dat het langste open leesraam oplevert wordt verondersteld het werkelijke te zijn. Gebruik de online applicatie Expasy om de DNA-sequentie om te zetten naar de eiwitsequentie [70].

Gebruik de eiwitsequentie in drie verschillende *blasts*:

- *Blast* tegen de databank van alle reeds beschreven eiwitten (databank *non-redundant protein sequences* (nr)) [71]
- *Blast* tegen de databank van nematode-EST's (*expressed sequence tags*)(tblastn, databank: expressed sequence tags, organisme: nematodes (taxid 6231)) [72]
- *Blast* tegen de voorspelde eiwitten in het genoom van *M. incognita* (programma: blastp, databank: Mi proteins (Annotation structural MincV1A1)) [73]

Als cut-off waarde voor een informatieve hit werden volgende criteria gebruikt: bitscore groter dan 50 en E-waarde kleiner dan 10^{-5} .

3.4 Silencing van potentiële effectorgenen

3.4.1 Ontwerpen van siRNA's (*small interfering RNA's*)

siRNA's voldoen in het ideale geval aan de volgende criteria:

- de sequentie start met AA: in het protocol wordt gebruik gemaakt van een exonuclease dat het resterende DNA van tijdens het syntheseproces wegnipt van het siRNA, dit enzyme stopt zijn activiteit bij AA
- 21 nucleotiden lang
- GC-gehalte tussen 30% en 50% (dit werd nagegaan via een online toepassing: de Oligonucleotide Properties Calculator [74])
- geen *silencing* van andere genen in het genoom van de nematode (Hoewel dit nooit met zekerheid kan gezegd worden aangezien het genoom van *Meloidogyne graminicola* niet gekend is, werd nagegaan of het siRNA kon binden op het genoom van *Caenorhabditis elegans*, m.b.v. de *blast tool* van ncbi [75]. Minder dan 14 nucleotiden overeenkomst met het *C. elegans* genoom is het criterium.)
- bevindt zich in een open regio van de secundaire structuur van het mRNA om een gemakkelijke binding toe te laten (De secundaire structuur van het mRNA werd voorspeld met de *RNA fold web server* [76].)

3.4.2 Synthese van siRNA's

De synthese van siRNA's werd uitgevoerd volgens het protocol voorzien in de *Silencer[®] siRNA Construction Kit* (Ambion, Life Technologies) [77].

3.4.3 Extractie van nematoden uit rijstwortels

Beschreven onder 3.2.2.

3.4.4 Behandelen van nematoden

1. Verzamel de nematoden in een zo klein mogelijk volume.
2. Breng 50 μ l nematoden in een RNase-vrij epje en voeg siRNA toe zodat een finale concentratie van 50 ng/ μ l siRNA wordt bereikt.
3. Laat de epjes roteren bij kamertemperatuur voor 24 uur.
4. Was minstens 2 keer met RNase-vrij water.

3.4.5 RNA-extractie

1. Gebruik het protocol van de *Qiagen Plant RNEasy Mini kit* voor RNA-extractie.
2. Na toevoegen van de extractiebuffer: soniceer 3 maal 10 seconden en koel tussendoor af op ijs.
3. Elueer het RNA in 30 μ l bij de laatste stap.
4. Meet de concentratie van het RNA met de nanodrop (Thermoscientific - Isogen lifesciences Nanodrop 2000 Spectrophotometer). Een 260/280 waarde van ongeveer 2 wijst op een goede kwaliteit van het RNA.

3.4.6 DNase-behandeling

1. Voeg volgende componenten samen:
 - 1 tot 3 μ g RNA
 - 1 μ l DNase (1u/ μ l) (Fermetas)
 - 3 μ l 10x reactiebuffer met $MgCl_2$ (Promega)
 - 0,5 μ l RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega)
2. Incubeer 30 minuten bij 37 °C.
3. Stop de reactie door 3 μ l 50 mM EDTA toe te voegen.
4. Incubeer 10 min bij 65°C.

3.4.7 cDNA-synthese

1. Voeg 1 μ l oligodT primer toe aan de 30 μ l DNase-behandeld RNA.
2. Incubeer 5 minuten bij 70°C.
3. Koel af in ijswater voor minstens 5 minuten.
4. Centrifugeer 10 seconden om het condensaat te verzamelen.

5. Voeg volgende componenten toe aan het epje:
 - 10 μ l GoScript 5x reactiebuffer (Promega)
 - 5 μ l 25mM $MgCl_2$
 - 2,5 μ l PCR nucleotide mix (finale concentratie van 0,5 mM voor elke nucleotide)
 - 1 μ l GoScript reverse transcriptase (Promega)
 - 0,5 μ l nuclease vrij water
6. Incubeer 5 minuten bij 25°C.
7. Incubeer 2 uur bij 42°C.
8. Incubeer 15 minuten bij 70°C om het reverse transcriptase te inactiveren.

3.4.8 Semikwantitatieve RT-PCR

1. Gebruik voor een semikwantitatieve RT-PCR dezelfde mastermix als weergegeven in 3.1.1.
2. Gebruik hetzelfde PCR-programma, maar met 40 i.p.v. 35 cycli.
3. Onderbreek de reactie na 25, 30, 35 en 40 cycli om een staal te nemen.
4. Visualiseer elk staal apart, laad exact hetzelfde volume PCR-product voor alle stalen.

3.4.9 Q-RT-PCR

1. Decontamineer alle materiaal en water een half uur onder UV-licht.
2. Werk in de gedecontamineerde omgeving. Maak volgende mengsels:
 - Mastermix: 10 μ l 2x SYBR No.Rox sensimix (Bioline) per reactie, 4 μ l gedestilleerd water per reactie en 1 μ l cDNA per reactie
 - Primermix: 2 μ l F primer (10 μ M) per reactie, 2 μ l R primer (10 μ M) per reactie en 6 μ l gedestilleerd water per reactie
3. Gebruik een negatieve controle: neem water als extra staal.
4. Gebruik de pipetteerrobot (*Westburg Corbett Robotics*) om de 72 well plaat te laten opvullen (5 μ l primermix per reactie en 15 μ l mastermix per reactie).
5. Sluit de plaat af m.b.v. een *sealer* om crosscontaminatie te voorkomen.
6. Gebruik het Q-PCR toestel (*Corbett Research - Westburg RotorGene RG-3000*) met volgend programma: 10 minuten bij 95°C - 25 seconden bij 95°C - 25 seconden bij 58°C - 20 seconden bij 70°C; 40 tot 50 cycli.

3.4.10 Analyse van Q-RT-PCR data

1. Runs waarbij de Ct-waarde van negatieve controles even groot is als deze van de stalen waar amplificatie wordt verwacht EN waarbij uit de smeltcurve blijkt dat het om amplificatie van hetzelfde fragment gaat, worden niet gebruikt voor analyse.
2. Selecteer de reacties waarvoor de efficiëntie groter is dan 1,65.
3. Bereken de gemiddelde Ct-waarden en efficiënties van de geselecteerde technische replica's.
4. Gebruik de REST-software (REST 2009, V2.0.13 - *mode* REST RG) voor analyse van deze gemiddelden.

3.5 Infectieproef met siRNA-behandelde nematoden

3.5.1 Kweken van rijstplantjes

1. Leg rijstzaden op een vochtig zakdoekje in een grote petrischaal en sluit deze af met parafilm.
2. Plaats 3 tot 4 dagen bij 30°C in het donker.
3. Bereid buizen met SAP (*synthetisch absorberend polymeer*)-medium voor:
 - Neem 2 kg fijn zand.
 - Voeg 300ml gedestilleerd water toe aan 3 gram SAP en laat minstens 2 uur staan om een gel te vormen.
 - Mix de gel en meng hem door het fijn zand.
 - Laat minstens 2 dagen staan om te drogen aan de lucht.
 - Plaats plastic folie in de PVC-buizen.
 - Vul de buizen met 20 ml fijn zand.
 - Voeg afwisselend 30 ml SAP en een overmaat gedestilleerd water toe tot de buis volledig vol is.
4. Plaats de zaailingen per 2 of 3 in een buis met SAP.
5. Geef 10 ml Hoagland-oplossing (zie tabel A.4.2) aan elke buis op 3,5 en 7 dagen na het planten.
6. Verwijder slechte plantjes op 7 dagen na het planten zodat 1 plantje per buis overblijft.

3.5.2 Infectie van rijstplantjes

Per nematodebehandeling worden er 8 planten geïnfecteerd, 10 dagen na het planten:

1. Infecteer elke plant met 250 nematoden door 2 gaatjes in het SAP-medium te prikken met een tipje en in elk gaatje 750 μ l nematodensuspensie te brengen.
2. Verzet de plantjes naar proefbuizen met ongeveer 5 ml Hoagland-oplossing 24 uur na infectie.

3.5.3 Fuchsine-kleuring

1. Plaats de wortels in *Micracloth*-zakjes en label ze met potlood.
2. Maak 30x *acid fuchsin* oplossing: 3,9 gram *acid fuchsin*, 750 ml water, 250 ml azijnzuur.
3. Verdun deze oplossing 30 maal en breng aan de kook.
4. Plaats de zakjes met wortels 3 minuten in de kokende oplossing.
5. Was de zakjes onder stromend kraantjeswater.
6. Haal de wortels uit de zakjes en plaats ze in 6-well platen met zuur glycerol (300 μ l HCl per 100 ml glycerol) voor ontkleuring.

3.5.4 Tellen van het aantal gallen

Spread de wortels van de plant uit op een petriplaat en tel het aantal gallen dat op de wortels van elke plant gevormd is.

3.5.5 Analyse van de data

Analyse van de data werd gedaan m.b.v. SPSS.

1. Controleer normaliteit van de data m.b.v. een *Kolmogorov-Smirnov test*.
2. Controleer homoscedasticiteit van de data m.b.v. een *modified Levene test*.
3. Indien de data normaal verdeeld en homoscedastisch zijn, vergelijk gemiddelden met een *Tukey test* (ANOVA).

3.6 Yeast-2-hybrid

3.6.1 Gateway klonering

3.6.1.1 Maken van attb-geflankeerd PCR-product

De sequentie van attb1 is 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T-3', deze van attb2 is 5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3' [78].

1. PCR1: voeg volgende elementen samen in een PCR-buisje:
 - 1 μ l plasmide met het gewenste fragment (1/50 verdunning na extractie (zie 3.1))
 - 3 μ l 10x key buffer (VWR)
 - 1 μ l dNTP's (5mM)
 - 1 μ l *forward* primer (10 μ M) (genspecifieke *forward* primer met deel van attb1 (zonder startcodon))
 - 1 μ l *reverse* primer (10 μ M) (genspecifieke *reverse* primer met deel van attb2 (inclusief stopcodon))
 - 22,5 μ l gedestilleerd water

Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,5 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l) (VWR) toe. De sequenties van de primers zijn weergegeven in bijlage B. Stel het PCR-toestel in als volgt:

- 1 minuut bij 94°C
 - 5 cycli: 15 seconden bij 94°C - 25 seconden bij 45°C - 1 minuut 30 seconden bij 72°C
 - 15 cycli: 15 seconden bij 94°C - 25 seconden bij 54°C - 1 minuut 30 seconden bij 72°C
2. PCR2: voeg volgende elementen samen in een PCR-buisje:
 - 3 μ l product uit PCR1
 - 3 μ l 10x key buffer (VWR)
 - 1 μ l dNTP's (5mM)
 - 1 μ l attb1 primer (10 μ M)
 - 1 μ l attb2 primer (10 μ M)
 - 20,5 μ l gedestilleerd water

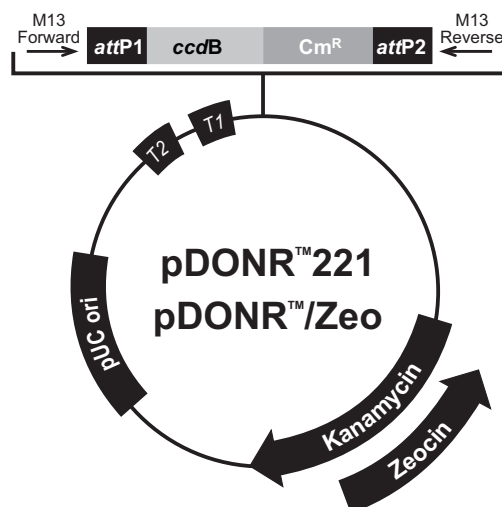
Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,5 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l) (VWR) toe. Stel het PCR-toestel in als volgt:

- 1 minuut bij 94°C

- 5 cycli: 15 seconden bij 94°C - 25 seconden bij 45°C - 1 minuut 30 seconden bij 72°C
 - 25 cycli: 15 seconden bij 94°C - 25 seconden bij 54°C - 1 minuut 30 seconden bij 72°C
3. Meet de concentratie attb-PCR-product met de nanodrop.

3.6.1.2 BP-reactie

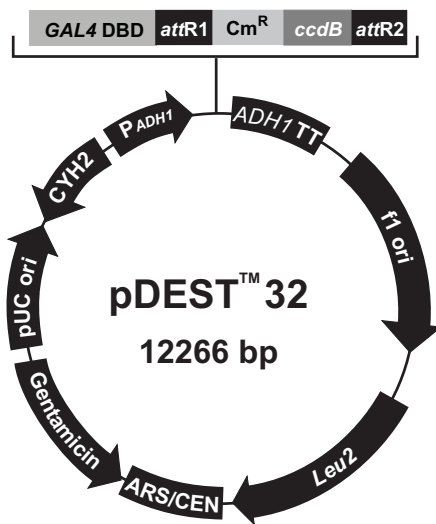
1. Voeg volgende componenten samen in een 1,5 ml epje bij kamertemperatuur en meng:
 - 1-3 μl attb-PCR product (totale hoeveelheid 10 tot 75 ng)
 - 1 μl donor vector (pDONR221, 75 ng/ μl (Figuur 3.2))
 - voeg water bij tot een totaal volume van 4 μl .
2. Dooi het BP Clonase II enzyme op ijs en mix het ongeveer 2 minuten. Vortex het enzyme tweemaal voor 2 seconden.
3. Voeg aan elk staal 1 μl BP Clonase II enzyme toe en vortex tweemaal kort.
4. Incubeer overnacht bij 25°C.
5. Om de reactie te stoppen: voeg 0,5 μl proteinase K (Ambion, Life Technologies) toe en incubeer 10 minuten bij 37°C.
6. Dit mengsel is nu klaar voor klonering: *heat shock* het volledige mengsel in *E. coli* (beschreven in 3.1.3).
7. Controleer de kolonies op aanwezigheid van het construct via kolonie-PCR (beschreven in 3.1.3), gebruik attb1 en attb2 en/of genspecifieke primers.
8. Zuiver het plasmide op (beschreven in 3.1.4).
9. Laat het opgezuiverde plasmide sequencen door een externe firma (*LGC Genomics*, Berlijn) om na te gaan of de klonering geslaagd is.



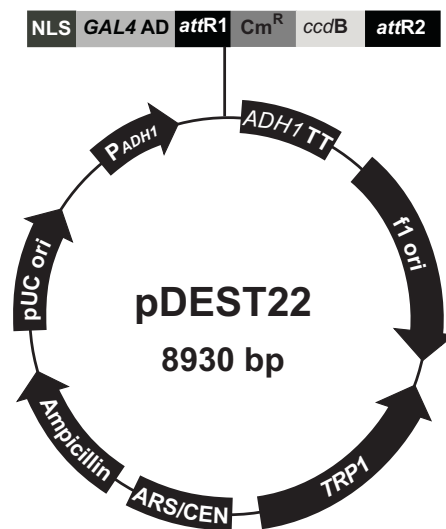
Figuur 3.2: Vectormap van de pDONR221 vector [79]

3.6.1.3 LR-reactie

1. Voeg volgende componenten samen in een 1,5 ml epje bij kamertemperatuur en meng:
 - 3 μ l plasmide uit BP-reactie
 - 1 μ l bestemmingsvector (pDEST32 (Figuur 3.3, 75 ng/ μ l))
 - voeg water bij tot een totaal volume van 4 μ l.
2. Dooi het LR Clonase II enzyme op ijs en mix het ongeveer 2 minuten. Vortex het enzyme tweemaal voor 2 seconden.
3. Voeg aan elk staal 1 μ l LR Clonase II enzyme toe en vortex tweemaal kort. Microcentrifugeer kort.
4. Incubeer overnacht bij 25°C.
5. Om de reactie te stoppen: voeg 0,5 μ l proteinase K (Ambion, Life Technologies) toe en incubeer 10 minuten bij 37°C.
6. Dit mengsel is nu klaar voor klonering: *heat shock* het volledige mengsel in *E. coli* (beschreven in 3.1.3).
7. Controleer de kolonies op aanwezigheid van het construct via kolonie-PCR (beschreven in 3.1.3), gebruik attb1 en attb2 en/of genspecifieke primers.
8. Zuiver het plasmide op (beschreven in 3.1.4).
9. Laat het opgezuiverde plasmide sequencen door een externe firma (*LGC Genomics*, Berlijn) om na te gaan of de klonering geslaagd is.



Figuur 3.3: Vectormap van de pDEST32 vector [80]



Figuur 3.4: Vectormap van de pDEST22 vector [81]

3.6.2 Voorbereiding

1. Strijk de controles (geen interactie, zwakke interactie en sterke interactie) uit op YPAD platen (zie bijlage A.5) en laat 2 dagen groeien bij 30°C.
2. Eenmaal de gisten voldoende gegroeid zijn: zet enkele kolonies over op een *-trp-leu* plaat (zie bijlage A.5) en laat 2 dagen groeien bij 30°C.

3. Strijk de lege giststam (Mav203) op YPAD platen en laat 2 dagen groeien bij 30°C.

3.6.3 Transformatie van giststam met *bait* en *bait* + lege *prey*

1. Breng een gistkolonie (lege stam Mav203) in 10 ml YPAD medium in een 50 ml falcon-proefbuis.
2. Breng 40 ml YPAD in een 50 ml falcon-proefbuis.
3. Plaats beide falcon-proebuizen overnacht op de schudder bij 30°C en 200 tpm. Kantel de falcon-proefbuizen een beetje zodat de gist niet kan bezinken.
4. Controleer de falcon-proefbuis met 40 ml op contaminatie. Ga verder met de rest van het protocol indien geen contaminatie.
5. Maak een tienvoudige verdunning van de gistcultuur met YPAD en meet OD600 (Optische Densiteit bij 600nm). Gebruik 1 ml YPAD als blanco.
6. Verdun de gistcultuur tot OD600=0,4 door de gepaste hoeveelheid cultuur toe te voegen aan de 40 ml falcon-proefbuis.
7. Verdun de verdunde cultuur over 2 falcon-proefbuizen en laat 3 uur groeien bij 30°C en 200 tpm.
8. Bereid intussen de plasmiden (3.6.1) voor voor de transformatie door volgende PCR-buisjes samen te stellen:
 - 100 ng bait plasmide (moet minder dan 2 μ l volume zijn) + 2 μ l Herring Sperm DNA (5 μ g/ μ l stock)
 - 50 ng bait plasmide + 50 ng leeg prey plasmide (pDEST22, Figuur 3.4) + 2 μ l Herring Sperm DNA (5 μ g/ μ l stock)
 - leeg (controle)
9. Centrifugeer de gistcultuur af bij 1100g voor 5 minuten bij kamertemperatuur.
10. Resuspendeer elke falcon-proefbuis in 40 ml steriel water.
11. Centrifugeer opnieuw bij 1100g voor 5 minuten bij kamertemperatuur, resuspendeer beide falcon-proefbuizen in 1 ml 1xLiAc/0,5xTE (zie bijlage A.5) en voeg beide falcon-proefbuizen samen.
12. Voeg 10 μ l van deze cellen toe aan de PCR-buisjes.
13. Voeg 70 μ l 1xLiAc/40%PEG/1xTE (zie bijlage A.5), pipetteer 2 maal op en neer.
14. Incubeer 30 minuten bij 30°C.
15. Voeg 8,8 μ l DMSO toe, pipetteer 3 maal op en neer.
16. *Heat shock* exact 7 minuten bij 42°C in het PCR-toestel.
17. Centrifugeer 1 minuut bij 1000g.
18. Neem het supernatans af zonder de pellet te verstoren (laat een beetje vloeistof over).
19. Los de pellets op in 100 μ l steriel water en pipetteer op en neer.
20. Plaat alles uit op kleine plaatjes:
 - transformanten met *bait* plasmide: op -leu medium (zie bijlage A.5)
 - transformanten met *bait* plasmide en leeg *prey* plasmide: op -*trp-leu* medium
 - negatieve controle: op -*trp-leu* medium (niets mag groeien)
21. Incubeer de platen ondersteboven bij 28°C voor 2 dagen.

3.6.4 Autoactivatietest

1. Pik 4 gistkolonies (*bait* + lege *prey*) op en resuspendeer elk in 100 μ l steriel water.
2. Doe hetzelfde voor de 3 controles (S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie).
3. Plaats druppels van 3 μ l van de suspensies op:
 - een nieuwe *-trp-leu* plaat (positieve controle, gisten moeten groeien)
 - een *-trp-leu-his* plaat (zie bijlage A.5) (gisten mogen niet groeien)
 - een *-trp-leu-uracil* plaat (zie bijlage A.5) (gisten mogen niet groeien)
 - een *-trp-leu* plaat met een filter voor een X-gal *assay* (zie 3.6.7)
4. Incubeer de platen voor 24 uur bij 30°C.
5. Controleer de resultaten: ga verder met bibliotheekscreening (zie 3.6.5) indien geen autoactivatie.

3.6.5 Bibliotheekscreening

1. Pik kolonies met *bait* plasmide op met een naald en plaats ze in 15 ml *-leu* medium.
2. Vortex en incubeer overnacht bij 200 tpm en 30°C, kantel de falcon-proefbuizen een beetje zodat de gist niet kan bezinken.
3. Maak een tienvoudige verdunning van de cultuur met *-leu* medium en meet OD600. Gebruik 1 ml *-leu* medium als blanco.
4. Verdun tot OD 0,1 door de gepaste hoeveelheid gistcultuur toe te voegen aan 150 ml *-leu* medium.
5. Laat ongeveer 4 uur groeien bij 200 tpm en 30°C.
6. Meet de OD600 opnieuw zonder te verdunnen. Ga verder als de OD 0,5 bereikt heeft.
7. Centrifugeer de cultuur af in 3 falcon-proefbuizen van 50 ml voor 5 minuten bij 1100g.
8. Resuspendeer elke pellet in 15 ml steriel water door zachtjes te schudden.
9. Voeg de 3 suspensies samen en centrifugeer nogmaals 5 minuten bij 1100g.
10. Resuspendeer de cellen in 750 μ l 1xTE/1xLiAc door zachtjes te schudden.
11. Mix het volgende in 14 verschillende 1,5 ml epjes en schud zachtjes (plaats de epjes op ijs):
 - 10 μ l Herring Sperm DNA (5 μ g/ μ l stock)
 - 1 μ l bibliotheek-DNA (1 μ g/ μ l)
 - 50 μ l geresuspendeerde gist-oplossing
12. Maak een extra controle-epje met enkel 50 μ l geresuspendeerde gist-oplossing.
13. Voeg voorzichtig 300 μ l 1xLiAc/40%PEG/1xTE toe aan elk epje, inverteer 2 maal traag om te mengen.
14. Incubeer 30 minuten bij 30°C.
15. Voeg 36 μ l DMSO toe aan elk epje, inverteer 2 maal traag om te mengen
16. *Heat shock* 10 minuten bij 42°C in een *heating block*.
17. Bereid epjes voor om de transformatie-efficiëntie te bepalen: kies 2 van de 14 epjes, maar een 1/100 verdunning door 10 μ l staal toe te voegen aan 990 μ l steriel water. Maak daarna een 1/1000 verdunning door 10 μ l uit de 1/100 verdunning te nemen en 90 μ l steriel water toe te voegen. Plaat deze 100 μ l uit op grote *-trp-leu* platen.
18. Plaat alle tubes met de 397 μ l mengsel uit op afzonderlijke grote *-trp-leu-his* platen.

19. Laat gesloten en ondersteboven drogen en sluit af met parafilm.
20. Incubeer ongeveer 1 week bij 30°C.

3.6.6 Verdere selectie van de gistkolonies die groeiden op *-trp-leu-his* medium

De gistkolonies die groeien op *-trp-leu-his* medium worden verder onderzocht om na te gaan of ook de andere reportergenen geactiveerd worden.

1. Bereid evenveel PCR-buisjes voor als het aantal kolonies op de platen.
2. Doe 100 μl water in de buisjes als de kolonies groot zijn, 50 μl als ze klein zijn.
3. Pik ongeveer dezelfde hoeveelheid van elke kolonie op met een gele tip door de kolonie ongeveer 4 keer aan te tikken tot de tip ongeveer 1 mm gevuld is met gist.
4. Pik de controlekolonies in de laatste 4 buisjes: *bait* + lege *prey*, geen interactie, zwakke interactie, sterke interactie.
5. Resuspendeer de gistkolonies door 10 keer op en neer te pipetteren (dit kan met de multipipet (25 μl)).
6. Spot 3 μl van elke kolonie op de volgende platen (probeer de platen niet aan te raken en pipetteer van de bodem aangezien de gist zal sedimenteren):
 - *-trp-leu* plaat (positieve controle, gisten moeten groeien)
 - *-trp-leu-his* plaat (om te controleren of de gisten opnieuw op dit medium groeien)
 - *-trp-leu-uracil* plaat (om te kijken naar sterke interacties)
 - een *-trp-leu* plaat met een Hybond N+ membraan er op voor een X-gal *assay* (zie 3.6.7) (doe deze plaat apart en laatst)
7. Laat de spots drogen, sluit de platen af met parafilm en incubeer ondersteboven overnacht bij 30°C.

3.6.7 X-gal assay

1. Maak X-gal oplossing in de trekkast: 12,5 mg X-gal, 100 μl DMF, 60 μl β -mercapto-ethanol en aanlengen met Z-buffer tot 10 ml.
2. Plaats een stuk Whatman-papier in een grote plastic petrischaal.
3. Giet de X-gal oplossing in de petrischaal en zorg ervoor dat het Whatman-papier volledig nat is zonder luchtbelletjes. Verwijder overtollige oplossing.
4. Neem de filter met gistkolonies van de plaat en houd hem met een pincet 30 seconden in vloeibare stikstof.
5. Wacht tot de filter ontdooit en leg hem dan op het Whatman-papier, met de kolonies naar boven.
6. Giet een klein beetje X-gal oplossing in de hoek.
7. Sluit de plaat af met parafilm en plaats deze gekanteld bij 37°C, met de controles aan de kant waar de extra vloeistof zich bevindt.
8. Controleer na 24 uur.

3.7 Vergelijking van expressie van effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode

3.7.1 Extraheren van nematoden uit rijstwortels

Beschreven in 3.2.2.

3.7.2 Kweken en infecteren van rijstplantjes

Beschreven in 3.5.1 en 3.5.2.

3.7.3 Verzamelen van de gallen

1. Verzamel gallen van telkens 8 planten op 2, 4, 7 en 10 dagen na infectie. Indien er nog geen gallen zichtbaar zijn: verzamel worteltipjes.
2. Leg de wortels van de plant in een RNase-vrije petrischaal en snij de gallen los met RNase-vrije scalpel en pincet.
3. Koel een RNase-vrij epje in vloeibare stikstof en doe de gallen erin. Bewaar bij -80°C.

3.7.4 RNA-extractie uit gallen

1. Maak vijzel en stamper RNase-vrij en koel ze in de vloeibare stikstof.
2. Voeg vloeibare stikstof bij de gallen in de vijzel en vermaal de gallen. Zorg dat de gallen niet ontdooien, voeg tijdig nieuwe vloeibare stikstof toe.
3. Verzamel het poeder in een RNase-vrij epje en plaats het opnieuw in de vloeibare stikstof.
4. Ga verder met het protocol beschreven onder 3.4.5.

3.7.5 DNase-behandeling en cDNA-synthese

Beschreven in 3.4.6 en 3.4.7.

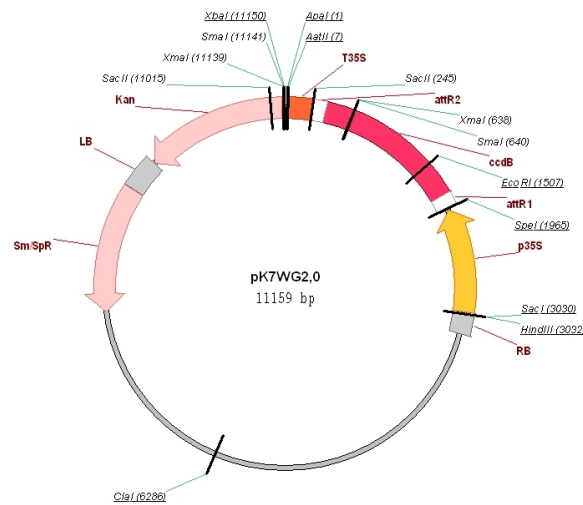
3.7.6 Q-RT-PCR en analyse van Q-RT-PCR data

Beschreven onder 3.4.9 en 3.4.10.

3.8 Transiënte expressie in tabak

3.8.1 Gateway klonering

Beschreven onder 3.6.1. In de LR-reactie wordt als bestemmingsvector nu pK7WG2 (75 ng/ μ l) gebruikt (Figuur 3.5). De primers die gebruikt worden zijn: genspecifieke *forward* primer met een deel van attb1 (inclusief startcodon) en genspecifieke *reverse* primer met een deel van attb2 (inclusief stopcodon) (weergegeven in B).



Figuur 3.5: Vectormap van de pK7WG2 vector [82]

3.8.2 Transformatie van *Agrobacterium tumefaciens*

3.8.2.1 Maak *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 hitteschok-competent

1. Maak 50 ml LB (zie tabel A.1.3) in een falcon-proefbuis van 250 ml.
2. Laat *Agrobacterium* cellen met VirG plasmide overnacht groeien bij 28°C in 5 ml LB (zie tabel A.1.3) met 25 µg/ml gentamicine.
3. Voeg 2 ml van de overnacht gegroeide cultuur toe aan de 50 ml LB-medium (zie tabel A.1.3).
4. Plaats op de schudder bij 28°C tot OD600 een waarde van tussen 0,5 en 1,0 bereikt (0,6 is het beste).
5. Koel af op ijs.
6. Centrifugeer bij 3000g voor 5 minuten bij 4°C en verwijder het supernatans.
7. Resuspendeer in 1 ml steriel 20mM $CaCl_2$.
8. Centrifugeer nogmaals, verwijder het supernatans en resuspendeer in 1 ml steriel 20mM $CaCl_2$.
9. Centrifugeer nogmaals, verwijder het supernatans en resuspendeer in 1 ml steriel 20mM $CaCl_2$.
10. Verdeel 100 µl in vooraf gekoelde epjes.
11. Bevries in vloeibare stikstof en bewaar bij -70°C.

3.8.2.2 Hitteschok

1. Ontdooi de hitteschok-competente cellen op ijs.
2. Voeg ongeveer 1 µg plasmide toe (zie 3.8.1).
3. Bevries in vloeibare stikstof.
4. Ontdooi in een 37°C warmwaterbad voor exact 5 minuten en voeg daarna 1 ml LB-medium (zie tabel A.1.3) toe en plaats op de schudder bij 28°C voor 2 uur.
5. Centrifugeer bij maximale snelheid, verwijder het meeste supernatans en resuspendeer de pellet in ongeveer 100 µl overgebleven vloeistof.
6. Plaat uit op LB-platen (zie tabel A.1.3) met de gepaste antibiotica en incubeer 2 tot 3 dagen bij 28°C.

3.8.2.3 Kolonie-PCR

Controleer vervolgens of de kolonies het gewenste fragment bevatten m.b.v. kolonie-PCR:

1. Bereid voor elke te testen kolonie een PCR-buisje voor met 15 μ l gedestilleerd water.
2. Raak de kolonies aan met een tipje, strijk hiermee over een nieuwe plaat en plaats dan het tipje in een PCR-buisje met water.
3. Pipetteer op en neer in de PCR-buisjes.
4. Denatureer de stalen 10 minuten bij 94°C.
5. Centrifugeer de PCR-tubes 5 minuten en breng 10 μ l supernatans over naar nieuwe PCR-buisjes.
6. Voeg de mastermix toe:
 - 0,5 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
 - 14,9 μ l gedestilleerd water
 - 3 μ l 10x key buffer (VWR)
 - 0,5 μ l dNTP's (5mM) (Invitrogen)
 - 0,5 μ l forward primer (10 μ M)
 - 0,5 μ l reverse primer (10 μ M)
7. Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,1 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l)(VWR) toe.
8. Gebruik het volgende PCR-programma: 35 seconden bij 94°C - 35 seconden bij 54°C - 1 minuut en 20 seconden bij 72°C.

Gebruik de attb1- en attb2-sequenties als primers.

3.8.3 Voorbereiding

Plaat volgende glycerolstocks uit op LB-medium (zie tabel A.1.3) met de gepaste antibiotica en laat 2 tot 3 dagen groeien:

- *Agrobacterium* Ag1 + R3a (Kanamycine 50 μ g/ml)
- *Agrobacterium* Ag1 + Avr3a (Kanamycine 50 μ g/ml)
- lege *Agrobacterium* GV3101 met VirG plasmide (Gentamycine 25 μ g/ml en Rifampicine 25 μ g/ml)
- *Agrobacterium* GV3101 met pK7WG2+GFP (groen fluorescent proteïne) (Gentamycine 25 μ g/ml en Spectinomycine 100 μ g/ml)
- *Agrobacterium* GV3101 met pK7WG2+ te testen nematodegen (Gentamycine 25 μ g/ml en Spectinomycine 100 μ g/ml)

3.8.4 Infiltratie

1. Laat een kolonie van alle *Agrobacteria* vermeld in 3.8.3 overnacht groeien in 5 ml LB (zie tabel A.1.3) met de gepaste antibiotica bij 28°C.
2. Centrifugeer 10 minuten bij kamertemperatuur en 750g.
3. Los de pellet op in 10ml vers bereide infiltratiebuffer (zie tabel A.6.1).
4. Herhaal de centrifugatiestap en los de pellet op in 5 ml infiltratiebuffer (zie tabel A.6.1).
5. Meet OD600 van een 1/10 verdunning van de verschillende *Agrobacterium*-culturen.

6. Verdun met infiltratiebuffer tot de OD 1,5 bedraagt (behalve voor R3a en Avr3a, daar moet de finale OD slechts 0,6 bedragen).
7. Laat 3 uur staan bij kamertemperatuur in het donker.
8. Maak volgende infiltratiemixen:
 - 1:1:1 GFP + R3a + Avr3a
 - 1:1:1 lege *Agrobacterium* + R3a + Avr3a
 - 1:1:1 *Agrobacterium* met te testen gen + R3a + Avr3a
9. Prik een gaatje in het blad van een tabaksplantje (*Nicotiana benthamiana*) met een naald tussen 2 nerven.
10. Infiltreer met een spuit vanaf de achterkant van het blad.
11. Infiltreer 3 bladeren op 1 plant met de volgende extra controles:
 - 1:2 Avr3a + infiltratiebuffer
 - 1:2 R3a + infiltratiebuffer
 - 1:2 GFP + infiltratiebuffer
 - 1:2 te testen gen + infiltratiebuffer

3.8.5 Evaluatie

Evalueer 2 dagen na infiltratie door score 1 toe te kennen als meer dan 50% van de geïnfilteerde oppervlakte een hypersensitieve respons vertoont of door score 0 toe te kennen als minder dan 50% van de geïnfilteerde oppervlakte een hypersensitieve respons vertoont.

3.8.6 Statistische analyse

Gebruik voor de statistische analyse een *Fisher's exact test* en voer deze uit in SPSS Statistics 21. De *Fisher's exact test* wordt toegepast in geval van twee nominale variabelen, in dit geval de co-infiltratie en de score. Nominale variabelen classificeren observaties in een klein aantal klassen: co-infiltratie met GFP, met een lege vector of met de potentiële effector en score 1 of 0. Het aantal stalen in deze test is relatief klein, in dat geval is een *Fisher's exact test* accurater dan een Pearson's Chi kwadraat test [83].

3.9 Transformatie van rijst

3.9.1 Callusvorming

Steriliseer de zaden van *Nipponbare*-rijst en zaai ze op callus-inducerend medium:

1. Verwijder het zaadomhulsel met de hand.
2. Bereid 50 ml 5% NaOCl met 2 druppels Tween 20.
3. Plaats de zaden in een 50 ml falcon-proefbuis en voeg een beetje 70% ethanol toe, schud en laat 5 minuten staan.
4. Verwijder de ethanol en voeg 50 ml NaOCl oplossing toe.
5. Plaats dit recipient op de rotor voor 30 minuten.

6. Giet de vloeistof weg en voeg een beetje steriel gedestilleerd water toe.
7. Schud en vervang het water door vers steriel gedestilleerd water.
8. Herhaal de vorige 2 stappen tot alle schuim en bleekgeur is verdwenen.
9. Plaats de zaden in een petriplaat met 1 of 2 lagen droog steriel filterpapier.
10. Gebruik een gesteriliseerde pincet om 10 tot 15 zaadjes op elke CIM (callus inducerend medium)-plaat (zie tabel A.1.1) te leggen.
11. Sluit de platen af met twee lagen leucopore tape en plaats in het donker bij 30°C.

Er werden 75 zaden per construct op CIM geplaatst.

Het CIM-medium (zie tabel A.1.1) bevat 2,4D (2,4-dichlorofenoxyazijnzuur). Deze stof is een auxine, auxines zijn plantenhormonen die onder andere callusvorming induceren.

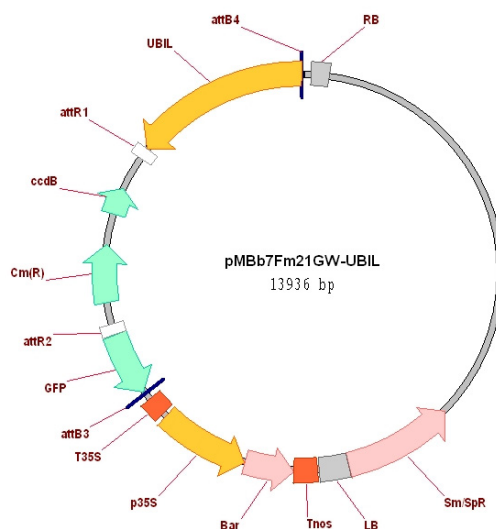
Na drie tot vier weken wordt het embryogeen weefsel geïsoleerd en overgeplaatst op nieuw CIM-medium. De plaatsing op vers medium zorgt voor een opstoot in callusgroei. Enkel callus dat klein, rond en compact, wit of lichtgeel van kleur en niet behaard is en dat los ligt op het medium (m.a.w. dat los van het zaad groeit of zeer los aan het scutellum is gehecht) wordt overgeplaatst.

1. Plaats de geselecteerde calli over op vers CIM-medium. Gebruik eventueel een scalpel om grotere stukken te versnijden.
2. Herhaal dit voor 3 platen in totaal.
3. Herhaal de 2 bovenstaande stappen tot alle callus is behandeld.
4. Sluit de platen af met twee lagen leucopore tape en plaats in het donker bij 30°C voor 4 dagen.

3.9.2 *Agrobacterium tumefaciens*-transformatie

3.9.2.1 Vector

De UK50 en UK52-genen werden beide gekloneerd in de pMBb7Fm21GW-UBIL vector (13936 bp) (Figuur 3.6). Deze constructen waren reeds beschikbaar bij het opstarten van dit experiment.



Figuur 3.6: Vectormap van de pMBb7Fm21GW-UBIL vector [84]

3.9.2.2 Transformatie van *Agrobacterium*

De *A. tumefaciens* stam EHA101 is zeer efficiënt in het transformeren van rijst. Via triparentale mating worden de *Agrobacterium*-cellen getransformeerd met ofwel het UK50 ofwel het UK52-nematodegen.

1. Maak 3 vloeibare culturen van 2 ml:
 - donorstam: *E. coli* met de vector pMBb7Fm21GW-UBIL (Figuur 3.6) - incubeer 1 dag op een schudder bij 37°C in LB-medium (zie tabel A.1.3) met 100 µg/ml spectinomycine
 - helperstam: *E. coli* HB101 pAK2013 - incubeer 1 dag op een schudder bij 37°C in LB-medium (zie tabel A.1.3) met 25 µg/ml kanamycine
 - acceptorstam: *A. tumefaciens* EHA101 - incubeer 2 dagen op een schudder bij 28°C YEB-medium (zie tabel A.1.2) met 100 µg/ml rifampicine
2. Meng een druppel van 100 µl van elke stam en plaats 100 µl mengsel op een plaat YEB-medium (zie tabel A.1.2) met 2mM MgSO₄. Spreid de druppel niet uit, maar laat hem drogen. Incubeer overnacht bij 28°C, plaats de plaat ondersteboven.
3. Schraap een beetje van de gegroeide cellen en suspendeer het in 1 ml YEB-medium (zie tabel A.1.2). Maak een verdunningsreeks (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) en plaat deze uit op YEB-medium (zie tabel A.1.2) met de gepaste antibiotica (100 µg/ml spectinomycine en 100 µg/ml rifampicine. Incubeer 3 dagen bij 28°C.

Controleer vervolgens of de kolonies het gewenste fragment bevatten m.b.v. kolonie-PCR zoals beschreven in 3.8.2.3. De primers worden gespecificeerd in sectie 4.8.1. Pas de lengte van de elongatiefase aan aan de lengte van de te verwachten fragmenten. Visualiseer de PCR-producten zoals weergegeven in 3.1.1.

3.9.3 *Agrobacterium*-gemedieerde callustransformatie

Plaats de *Agrobacterium*-kolonies die het construct bevatten uit op YEB-medium (zie tabel A.1.2) met 100 µg/ml spectinomycine en 100 µg/ml rifampicine. Incubeer 2 dagen bij 28°C, plaats de plaat ondersteboven.

De calli worden geïnoculeerd met de *A. tumefaciens*-cellen die nu het construct bevatten.

1. Voeg acetosyringone (zie tabel A.1.7) toe aan AA-1 (zie tabel A.1.8) tot een finale concentratie van 100µM en schud goed.
2. Pipetteer 21 ml AA-1 + acetosyringone in een steriele 50 ml falcon-proefbuis.
3. Voeg hieraan *Agrobacterium* toe.
4. Resuspendeer de *Agrobacterium* door te pipetteren of te vortexen.
5. Meet OD600 van deze suspensie.
6. Verdun de suspensie met AA-1 + acetosyringone tot de OD tussen 1,0 en 1,2 ligt.
7. Schraap de calli in ongeveer 10 ml *Agrobacterium*-suspensie.
8. Verklein grote calli met een scalpel.
9. Laat 5 tot 8 minuten staan en schud minstens 1 keer ondertussen.
10. Verspreid de calli over het oppervlak van R2COMAS-platen (zie tabel A.1.6).
11. Laat de platen drogen aan de lucht en sluit ze af met leucopore tape.

12. Herhaal dit voor alle platen met calli.
13. Plaats ze in het donker bij 26°C.

Het R2COMAS-medium bevat eveneens 2,4D.

3.9.4 Selectie van getransformeerde calli

De calli worden nu overgezet op een selectiemedium zodat enkel de getransformeerde calli overleven. Enkel calli die van middelmatige grootte zijn, geen necrose of *Agrobacterium*-overgroei vertonen en hard/stevig en crèmekleurig zijn worden overgeplaatst.

1. Voeg 500 μ l timentin toe aan 500 ml steriel water.
2. Schraap de calli in een petriplaat met ongeveer 10 ml timentin-water.
3. Vervang het timentin-water door vers timentin-water tot het water helder wordt.
4. Ongeveer 30 calli worden op één N6-selectiemedium-plaat (zie tabel A.1.9) geplaatst.
5. Sluit de platen af en plaats ze in het licht bij 30°C.

Het N6-selectiemedium bevat 2,4D, glufosinaatammonium en timentin. Glufosinaat ammonium is het actieve ingrediënt van verschillende herbicides, waaronder Basta. De getransformeerde calli zijn bestand tegen dit herbicide. De vector die door *Agrobacterium* werd binnengebracht in het genoom van de plantencellen bevat namelijk een Bar-gen, wat staat voor "Basta-resistentie" (Figuur 3.6). Timentin is toxisch voor *Agrobacterium tumefaciens* en dient om de resterende bacteriecellen af te doden.

3.9.5 Regeneratie

Calli die overleven op het N6-selectiemedium zijn potentieel getransformeerd, deze worden overgeplaatst op preregeneratiemedium. Bij voorkeur worden enkel losliggende, lichtgeel gekleurde of witte calli overgezet. De grootte van de calli is niet van belang.

1. Plaats potentieel transgene calli over op preregeneratiemedium (zie tabel A.1.10), ongeveer 20 per plaat.
2. Sluit de platen af met leucopore tape en plaats ze in het licht bij 30°C.

Dit preregeneratiemedium bevat 2,4D, basta en timentin, net als het N6-selectiemedium.

3.9.5.1 Scheut-inductie

Na 2 weken op dit preregeneratiemedium zouden de echt transgene calli moeten verviervoudigd zijn in grootte. Deze worden overgezet op regeneratiemedium. De calli mogen niet te groot zijn.

1. Plaats enkel kleine calli over op gesectioneerde regeneratiemedium-platen (zie tabel A.1.11).
2. Plaats de calli die horen bij 1 event in 1 sectie van een petriplaat (maximum 20). Nummer elke sectie.
3. Sluit de platen af met leucopore tape en plaats ze in het licht bij 30°C.

Dit regeneratiemedium bevat een cytokine, nl. zeatine. Deze stof bevordert de celdeling en induceert scheutvorming.

3.9.5.2 Wortel-inductie

De scheuten worden na 3 tot 4 weken overgeplaatst in aparte proefbuizen met wortelinducerend medium.

1. Haal een scheutje uit de plaat en leg het op het deksel van de petriplaat.
2. Trim de wortels tot een lengte van ongeveer 1 cm.
3. Verwijder bladeren die bruin kleuren.
4. Plaats de scheuten met de basis in de agar (wortelinducerend medium (zie tabel A.1.12)) tot ongeveer 0,5 cm diepte.
5. Sluit de proefbuis af met leucopore tape en markeer hem met het nummer van het event.
6. Doe dit zo voor alle reeds voldoende gegroeide scheutjes.
7. Plaats de proefbuizen in het licht bij 30°C, alsook de nog niet voldoende gegroeide scheutjes op het regeneratiemedium.
8. Herhaal dit alles wanneer er nieuwe scheutjes voldoende gegroeid zijn (een paar dagen later).

Het wortelinducerend medium bevat MES, deze stof is bevorderlijk voor de wortelvorming.

3.9.6 Testen van aanwezigheid van het gen

De planten die bekomen worden zijn potentieel transgeen, er moet echter nog gecontroleerd worden of ze het nematodegen wel degelijk bevatten. Hiertoe wordt een DNA-extractie van bladmateriaal toegepast, gevolgd door een PCR op dit DNA.

3.9.6.1 DNA-extractie

1. Verzamel bladmateriaal in een epje, vermijd contaminatie tussen de verschillende stalen.
2. Voeg 400 μ l extractiebuffer toe (200mM TrisHCl (pH 7,5), 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS).
3. Plaats 15 minuten bij 95°C in een thermoblock.
4. Voeg 50 μ l chloroform toe en schud.
5. Centrifugeer 5 minuten.
6. Neem 200 μ l van de bovenste laag en voeg 200 μ l isopropanol toe.
7. Centrifugeer 10 minuten.
8. Was met ethanol.
9. Los op in 30 μ l water.

3.9.6.2 PCR

Plaats bij het voorbereiden van een PCR alle producten steeds op ijs. Voeg volgende componenten samen (*mastermix*):

- 2 μ l DNA
- 2 μ l 10x key buffer (VWR)
- 0,5 μ l dNTP's (5mM) (Invitrogen)
- 0,5 μ l *forward* primer (10 μ M)

- 0,5 μ l reverse primer (10 μ M)
- 14,4 μ l gedestilleerd water

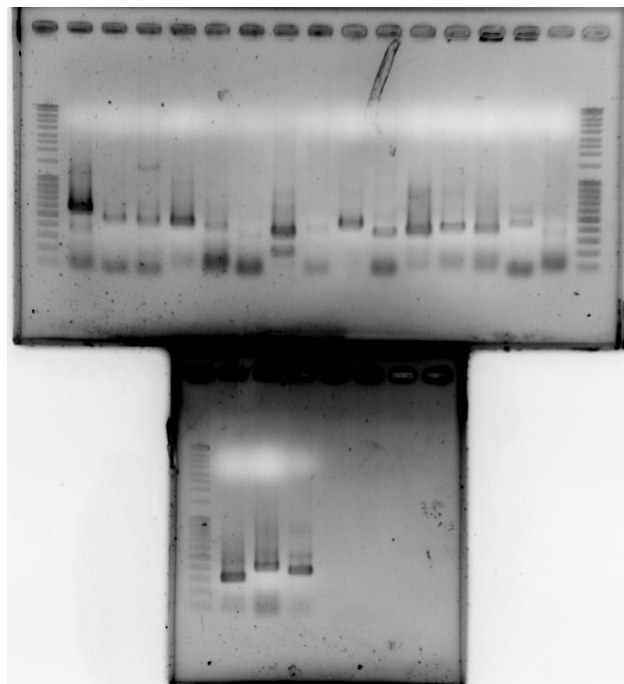
Voeg vlak voor het opstarten van de PCR-reactie 0,1 μ l Taq-polymerase (1u/ μ l) (VWR) toe. Stel het PCR-toestel in op 35 maal volgende cyclus: 30 seconden bij 94°C (denaturatie) - 30 seconden bij 54°C (hybridisatie) - 30 seconden bij 72°C (elongatie). Visualiseer de PCR-producten zoals beschreven in 3.1.1. De primers worden gespecificeerd in sectie 4.8.3.

Hoofdstuk 4

Resultaten

4.1 Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector

Voor verscheidene toepassingen moeten de effectorgenen beschikbaar zijn in pGEM-T vectors. De genen werden vermenigvuldigd door een cDNA-staal van nematoden te gebruiken in PCR-reacties met verschillende genspecifieke primerparen van potentiële effectors (zie sectie 3.1). In figuur 4.1 is duidelijk zichtbaar dat de meeste van de 18 fragmenten geamplificeerd werden. Het betreft volgende fragmenten: UK8 (526 bp), UK18 (424 bp), UK23 (428 bp), UK44 (400 bp), UK63 (377 bp), UK64 (306 bp), UK65 (330 bp), UK66 (356 bp), UK67 (377 bp), UK68 (327 bp), UK69 (331 bp), UK70 (359 bp), UK71 (337 bp), UK72 (400 bp), UK73 (321 bp), UK74 (301 bp), UK75 (377 bp), UK76 (350 bp) (in deze volgorde weergegeven in figuur 4.1, te starten bovenaan links). De sequenties van de genen en bijhorende genspecifieke primerparen staan weergegeven in bijlagen B en C.



Figuur 4.1: Visualisatie van de PCR-producten na amplificatie van 18 verschillende fragmenten uit nematode-cDNA

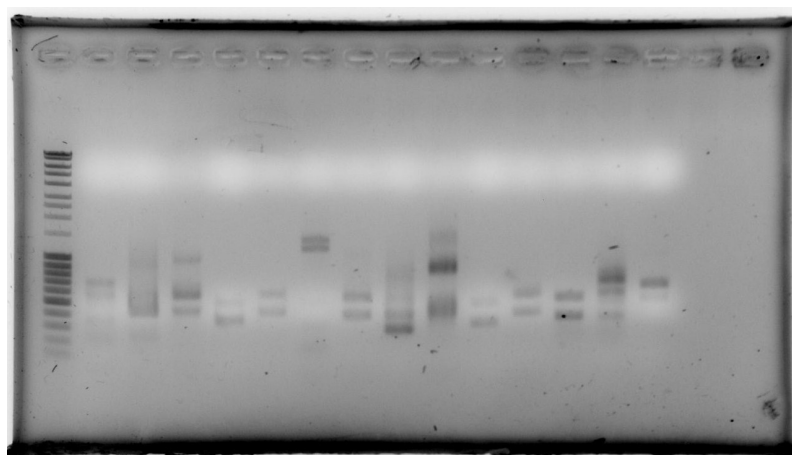
Deze PCR-producten werden vervolgens gekloneerd in de pGEM-T vector (met uitzondering van het UK69 fragment). Deze vectors werden dan via hitteschok in *E. coli* gebracht om te vermenigvuldigen. De kolonies werden via kolonie-PCR gecontroleerd op aanwezigheid van het construct. Voor de genen UK63, UK64 en UK66 werden geen kolonies bekomen die het construct bevatten. De andere plasmiden werden uit *E. coli* geëxtraheerd. Door de plasmiden te visualiseren op gel werd bevestigd dat de extractie succesvol was.

4.2 Lokalisatie van expressie

Lokalisatie van expressie gebeurt aan de hand van een in-situ hybridisatie (zie sectie 3.2). Deze techniek maakt gebruik van DIG-gelabelde probes. De nematoden worden gefixeerd en de probes worden in-situ, dus in de nematode zelf, gehybridiseerd. Het is de *antisense*-probe die wordt toegevoegd voor hybridisatie, deze is complementair aan het mRNA van het gen in kwestie. Vervolgens vindt de kleuring plaats: om de probe zichtbaar te maken worden antilichamen toegevoegd die specifiek binden op de DIG-labels die op de probes zijn aangebracht. Het antilichaam is gekoppeld met een enzyme dat een later toegevoegd substraat omzet tot een bruin gekleurd, onder de microscoop zichtbaar product. De probe wordt gelokaliseerd door een aantal nematoden onder de microscoop te bekijken.

4.2.1 Constructie van de probes

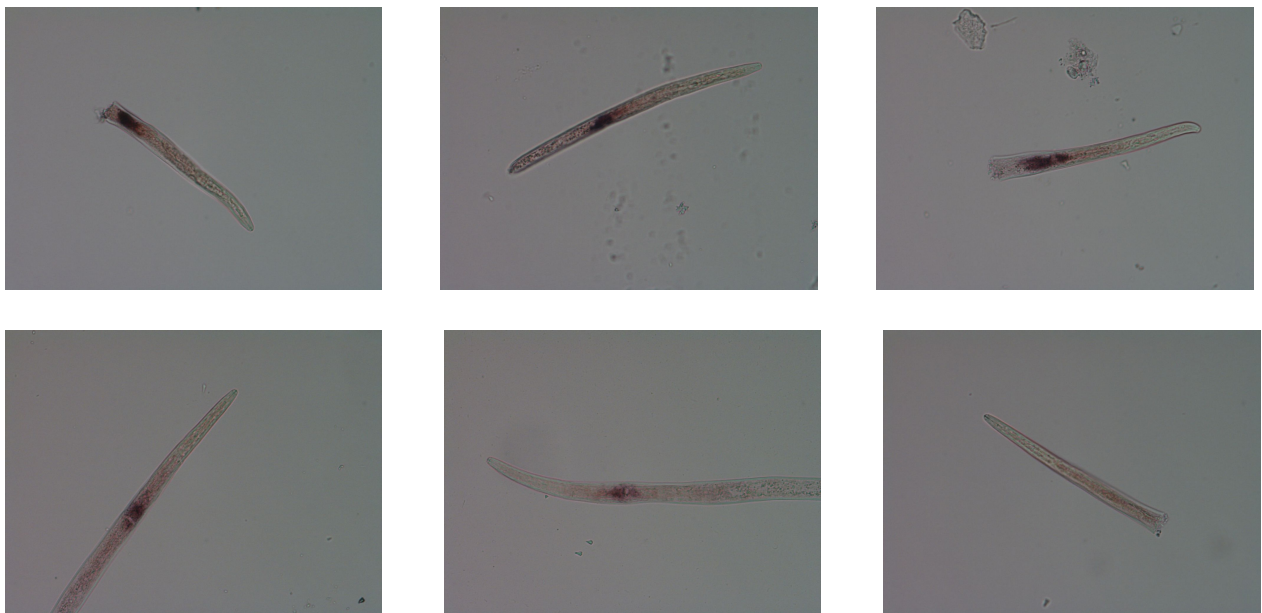
De constructie van 14 verschillende probes (zie sectie 3.2.1) werd gecontroleerd door ze te laden op een gel. Op figuur 4.2 is te zien dat de constructie succesvol was. De vreemde patronen zijn eigen aan probes. Er werden 13 *antisense* probes gemaakt en 1 *sense* probe die gebruikt werd in de negatieve controle-behandeling.



Figuur 4.2: Visualisatie van de DIG-gelabelde probes: van links naar rechts: MassRuler ladder mix, UK8 *sense* (voor negatieve controle), UK18, UK23, UK44, UK65, UK67, UK68, UK70, UK71, UK72, UK73, UK74, UK75, UK76

4.2.2 In-situ hybridisatie

Volgende genen werden getest: UK23, UK44, UK65, UK67, UK68, UK70, UK71, UK73, UK74, UK75 en UK76. Er werd enkel een signaal waargenomen bij hybridisatie tegen de probe van het gen UK67. Dit gen blijkt tot expressie te komen in de faryngeale klieren, zoals te zien is in figuur 4.3. Er is geen informatie over de plaats waar de andere genen tot expressie komen. Als negatieve controle werd een probe gesynthetiseerd waarbij in reactie 2 (zie 3.2.1) de F-primer van het UK8 gen werd gebruikt. Dit is een *sense* probe en kan bijgevolg niet binden op het mRNA van het gen.



Figuur 4.3: Vijf microscopische beelden (300x) van *Meloidogyne graminicola* na in-situ hybridisatie met een probe tegen het gen UK67; de afbeelding rechts onderaan is de negatieve controle (*sense* probe UK8)

4.3 Blasten van de potentiële effectors UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67

De genen die gedurende deze thesis het meest aan bod komen, werden *geblast* tegenover verschillende databanken (zie sectie 3.3). Als zoekterm werden niet de cDNA-sequenties, maar de overeenkomstige eiwitsequenties gebruikt. Eerst en vooral werd er *geblast* tegenover de databank van alle reeds beschreven eiwitten (*non-redundant protein sequences* (nr)). Echter, er zijn ook heel wat sequenties bekend die wel tot expressie komen in nematoden, maar nog niet danig uitvoerig werden bestudeerd om in de eiwitdatabank opgenomen te zijn. Deze sequenties zijn opgenomen in de databank van *expressed sequence tags* (ESTs) van nematoden. Er werd *geblast* met een eiwit-zoekterm tegen de vertaalde sequenties van deze EST's. Tot slot werd ook *geblast* tegenover de voorspelde eiwitten uit het genoom van *Meloidogyne incognita*. De resultaten worden weergegeven in tabel 4.1.

De hits voor UK8 waren afkomstig van *M. chitwoodi* J2-stadium nematoden, *M. hapla* ei- en J2-stadia, *M. incognita* wel en niet gestresseerde J2-stadium nematoden en *M. arenaria* J2-stadium nematoden. De hits voor UK28 waren allemaal afkomstig van *M. chitwoodi* J2 stadium nematoden.

Tabel 4.1: Resultaten van de *blasts* tegen verschillende databanken met de eiwitsequenties van de nematodegenen UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67. "-" staat voor "geen informatieve hits".

potentiële effectors	Databank	nr	EST's nematoden	<i>M. incognita</i>
	UK8	-	26 informatieve hits	-
	UK28	-	35 informatieve hits	-
	UK50	-	-	-
	UK52	-	-	-
	UK67	-	-	-

4.4 Silencing van potentiële effectors

4.4.1 UK50 en UK52

4.4.1.1 Ontwikkeling en synthese van de siRNA's

Bij de ontwikkeling van siRNA's tracht men zoveel mogelijk te vermijden dat andere genen in het *M. graminicola* genoom ook worden *gesilenced*. Hiervoor wordt minder dan 14 nucleotiden overlap met een sequentie in het genoom van *C. elegans* als criterium gebruikt. De genen die gedeeld worden door *Meloidogyne graminicola* en *C. elegans* zijn over het algemeen genen die noodzakelijk zijn voor het overleven van de nematoden, maar niet voor infectie. Op die manier wordt dus de kans gevoelig verkleind op het ongewenst *silencen* van een ander gen dan de potentiële effector. Ook werd getracht de siRNA's zoveel mogelijk te kiezen in een open regio van het mRNA, hoewel dit niet altijd compatibel was met de andere criteria (zie sectie 3.4.1).

Voor de *silencing* werd in dit experiment gebruik gemaakt van reeds gesynthetiseerde siRNA's, daar de synthese van nieuwe siRNA's niet succesvol was volgens metingen met de nanodrop. Er werden vier verschillende siRNA's gebruikt, twee gericht tegen het UK50-gen en twee tegen het UK52-gen. In bijlage B zijn de verschillende gebruikte siRNA-sequenties weergegeven.

4.4.1.2 Behandeling van de nematoden

Vervolgens werden vier verschillende batchen van nematoden geïncubeerd in deze siRNA's (zie sectie 3.4). Als controlebehandelingen werden in elk *silencing*-experiment nematoden geïncubeerd in siRNA's gericht tegen het GFP-gen en in water. De GFP-sequentie is uiteraard niet aanwezig in het genoom van *Meloidogyne graminicola*. We verwachten dus dat de expressie van alle genen niet verschilt tussen de beide controlebehandelingen. Indien er wel een verschil is, betekent dit dat de expressie van de te *silencen* genen beïnvloed wordt door de zuivere aanwezigheid van siRNA's, ongeacht de sequentie. Dit is een ongewenst effect, daar dit impliceert dat de aanwezigheid van siRNA's niet enkel een invloed heeft op het te *silencen* gen. Het fenotype dat waarneembaar is bij de siRNA-behandelde nematoden is bijgevolg niet enkel het resultaat van het uitschakelen van het onderzochte gen. We willen enkel het effect testen van de *silencing* van één bepaald gen, niet het gezamenlijke effect van een veranderde expressie van meerdere genen. Omwille van deze reden werden de data van de experimenten waar het expressieniveau van een bepaald gen te sterk verschilt tussen beide controles, buiten beschouwing gelaten.

Het volledige experiment werd opgezet in twee biologische herhalingen. Om na te gaan of de *silencing*

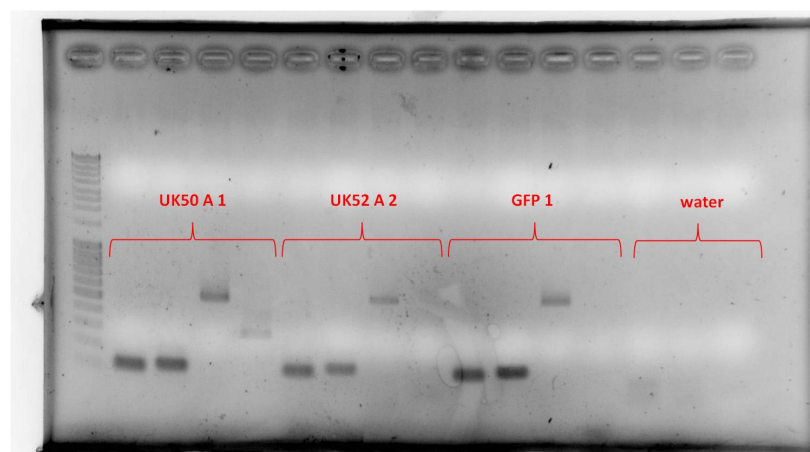
geslaagd is, werd een RNA-extractie en cDNA-synthese uitgevoerd, gevolgd door (semi)kwantitatieve-RT-PCR (zie secties 4.4.1.4 en 4.4.1.5).

4.4.1.3 Controle van de kwaliteit van het cDNA

Metingen met de nanodrop toonden een relatief slechte kwaliteit en lage concentratie RNA (zie tabel 4.2). De kwaliteit kan afgeleid worden uit de 260/280 waarde die wordt meegegeven bij iedere concentratiemeting. Toch werd het RNA omgezet naar cDNA. Er werd een test-PCR uitgevoerd met primers voor twee referentiegenen (EEF1A- en ACT2-primers), primers voor UK8 en primers voor UK74 (zie bijlage B en C) op het cDNA van de nematoden behandeld met siRNA 50A (eerste replica), siRNA 52A (tweede replica) en siRNA GFP (eerste replica). Deze test-PCR diende om na te gaan of het cDNA van voldoende kwaliteit was om amplificatie toe te laten. Er werd ook een negatieve controle ingevoegd. Uit figuur 4.4 blijkt dat amplificatie wel mogelijk was.

Tabel 4.2: Concentraties RNA na extractie uit siRNA-behandelde nematoden (UK50 en UK52). Bij stalen met een "-" werd de concentratie niet genoteerd wegens te slechte kwaliteit.

RNA van nematoden behandeld met ...	biologische replica	concentratie RNA (ng/ μ l)
siRNA 50A	1	17,4
siRNA 50B	1	17,6
siRNA 52A	1	6,1
siRNA 52B	1	9,1
siRNA GFP	1	13
water	1	-
siRNA 50A	2	geen elutie
siRNA 50B	2	geen elutie
siRNA 52A	2	-
siRNA 52B	2	-
siRNA GFP	2	7,8
water	2	3,9



Figuur 4.4: Visualisatie van de PCR-producten na amplificatie van met ACT2-, EEF1A-, UK8- en UK74-primers in cDNA van nematoden behandeld met siRNA. Van links naar rechts: staal UK50A eerste replica (primers ACT2, EEF1A, UK8, UK74), staal UK52A tweede replica (primers idem), staal GFP eerste replica (primers idem), water (primers ACT2,EEF1A,UK8)

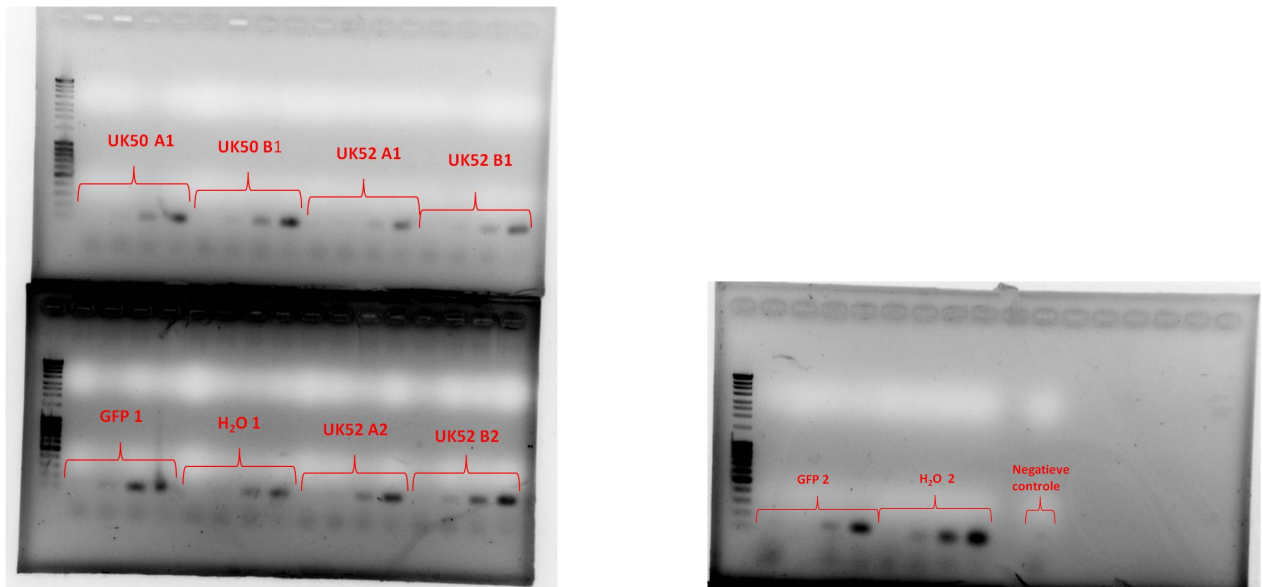
4.4.1.4 Semikwantitatieve reverse transcriptase PCR

Nadien werden verschillende semikwantitatieve RT-PCR's uitgevoerd. Op deze manier werd geprobeerd semikwantitatieve informatie te bekomen over de concentraties mRNA in de nematoden, met de bedoeling te concluderen of de *silencing* al dan niet geslaagd was. Eerst werden semikwantitatieve RT-PCR's uitgevoerd met het ACT2-referentieprimerpaar (amplificatie van een fragment uit het actinegen (102 bp)). Hierbij werd de hoeveelheid template cDNA via *trial-and-error* aangepast met als bedoeling de fase waarin de hoeveelheid DNA exponentieel toeneemt voor alle stalen na evenveel cycli te laten optreden. De hoeveelheden cDNA waarbij dit het geval was, zijn weergegeven in tabel 4.3 en het resultaat van de PCR met deze hoeveelheden cDNA wordt weergegeven in figuur 4.5. In tabel 4.3 ontbreken twee waarden, er werd namelijk geen elutie bekomen tijdens de RNA-extractie voor deze twee stalen.

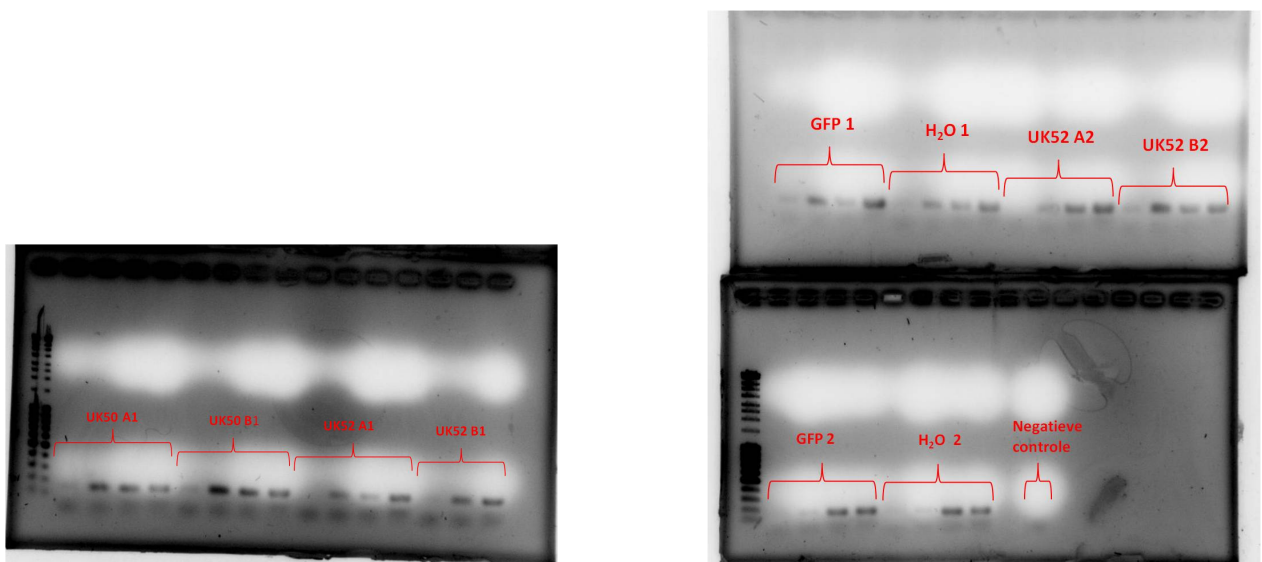
Tabel 4.3: Hoeveelheden cDNA gebruikt als template in semikwantitatieve Q-PCR (bepaald m.b.v. semikwantitatieve RT-PCR van het actine-referentiegen). Voor twee stalen was geen cDNA beschikbaar.

Eerste replica		Tweede replica	
nematoden behandeld met ...	hoeveelheid cDNA (μ l)	nematoden behandeld met ...	hoeveelheid cDNA (μ l)
siRNA 50A	0,5	siRNA 50A	-
siRNA 50B	1	siRNA 50B	-
siRNA 52A	1	siRNA 52A	1,5
siRNA 52B	1	siRNA 52B	1
siRNA GFP	1	siRNA GFP	1
water	1,5	water	1,5

Nadien werden de hoeveelheden cDNA weergegeven in tabel 4.3 gebruikt om het expressieniveau van UK50 of UK52 semikwantitatief te benaderen. Semikwantitatieve RT-PCR werd uitgevoerd met Q-PCR primers (weergegeven in bijlage B). Het resultaat is weergegeven in figuur 4.6. De stalen uit de eerste biologische replica (zowel van UK50 als van UK52) vertonen hetzelfde patroon als de bijhorende controlestalen (behandeling met water en siRNA tegen GFP). De stalen van UK52 uit de tweede replica lijken een grotere concentratie UK52-RNA te bevatten dan de controlestalen. Op basis van deze semikwantitatieve RT-PCR is de *silencing* dus niet succesvol. Deze resultaten dienen echter wel voorzichtig geïnterpreteerd te worden aangezien ze afkomstig zijn uit een semikwantitatieve analyse. Bovendien is de visuele interpretatie vrij subjectief.



Figuur 4.5: Visualisatie van de producten van semikwantitatieve RT-PCR (primers: ACT2 (102 bp)) met starthoeveelheden cDNA zoals weergegeven in tabel 4.3; LINKS BOVENAAN: cDNA van nematoden behandeld met siRNA UK50A1 (laantjes 2-5), UK50B1 (laantjes 6-9), UK52A1 (laantjes 10-13), UK52B1 (laantjes 14-17); LINKS ONDERAAN: cDNA van nematoden behandeld met siRNA GFP1 (laantjes 2-5), H_2O 1 (laantjes 6-9), UK52A2 (laantjes 10-13), UK52B2 (laantjes 14-17); RECHTS: cDNA van nematoden behandeld met siRNA GFP2 (laantjes 2-5), H_2O 2 (laantjes 6-9), negatieve controle (laantje 11); het cijfer geeft de biologische replica aan



Figuur 4.6: Visualisatie van de producten van semikwantitatieve RT-PCR (primers: UK50-Q-PCR of UK52-Q-PCR; zie bijlage B) met starthoeveelheden cDNA zoals weergegeven in tabel 4.3; LINKS: cDNA van nematoden behandeld met siRNA UK50A1 (laantjes 2-5), UK50B1 (laantjes 6-9), UK52A1 (laantjes 10-13), UK52B1 (laantjes 14-16, laantje 17 ontbreekt, het overeenkomstige staal is niet geladen); BOVENAAN RECHTS: cDNA van nematoden behandeld met siRNA GFP1 (laantjes 2-5), H_2O 1 (laantjes 6-9), UK52A2 (laantjes 10-13), UK52B2 (laantjes 14-17); ONDERAAN RECHTS: cDNA van nematoden behandeld met siRNA GFP2 (laantjes 2-5), H_2O 2 (laantjes 6-9), negatieve controle (laantje 10); het cijfer geeft de biologische replica aan

4.4.1.5 Kwantitatieve reverse transcriptase PCR (Q-RT-PCR)

Aangezien de amplificatie bij de semikwantitatieve RT-PCR toch succesvol bleek, maar niet de verwachte resultaten opleverde, werd alsnog Q-RT-PCR toegepast op het cDNA (zie sectie 3.4.9). Zowel voor UK50 als voor UK52 en voor de beide biologische replica's werden als referentie de primerparen EEF1A en ACT2 gebruikt.

Nematoden behandeld met siRNA's tegen UK50 In de eerste plaats werd nagegaan of de expressie van UK50 in de twee controlestalen (nematoden behandeld met siRNA tegen GFP en met water) gelijk was. Voor de eerste biologische replica bleek de expressie voldoende gelijkend tussen beide stalen (slechts een factor 1,18 verschil, zie bijlage E.1). Analyse van de twee UK50-siRNA-behandelde stalen uit de eerste biologische replica leverde onverwachte resultaten op. Het opzet van dit RNAi-experiment was om UK50 neer te reguleren, de expressie ervan te *silencen*. De analyse van de Q-PCR data toonde echter een opregulatie van UK50 in de twee UK50-siRNA behandelde stalen t.o.v. beide controlestalen (zie tabel 4.4). De output van de REST-analyse (zie sectie 3.4.10) is weergegeven in bijlage E. Op basis van de Q-RT-PCR resultaten blijkt de siRNA-behandeling dus een sterkere expressie teweeggebracht te hebben.

Tabel 4.4: Opregulatie van UK50 in nematoden behandeld met siRNA gericht tegen dit gen vergeleken met nematoden uit twee controlebehandelingen

Staal	siRNA 50A	siRNA 50B
Controle		
siRNA GFP	opgereguleerd (x2)	opgereguleerd (x2,2)
water	opgereguleerd (x1,6)	opgereguleerd (x1,8)

Ook voor de tweede biologische replica werd eerst de expressie van UK50 in de twee controlestalen vergeleken. De expressie van UK50 was ruim 7 maal hoger in het GFP-siRNA behandelde staal dan in het water-behandelde staal (zie bijlage F.1). De tweede replica kon dus niet gebruikt worden om besluiten uit te trekken.

Nematoden behandeld met siRNA's tegen UK52 Van de eerste biologische replica waren er geen data beschikbaar van de amplificatie van het UK52-fragment in het GFP-siRNA behandelde staal. Hierdoor kon niet worden nagegaan of de controlestalen gelijke expressie van het UK52-gen vertoonden. Bijgevolg konden de data van deze replica niet geïnterpreteerd worden.

Ook voor de tweede biologische replica werd nagegaan of de expressie van UK52 in de twee controlestalen gelijk was. Hier verschilde de expressie van UK52 zeer sterk tussen de twee controlestalen. De expressie was 11,5 maal hoger in het GFP-siRNA behandelde staal dan in het water-behandelde staal (zie bijlage F.2). De data van de tweede biologische replica werden dan ook niet verder geanalyseerd.

4.4.2 UK8

Het opzet van deze proef was analoog aan de voorgaande proef (zie sectie 4.4.1). Daarnaast werden de siRNA-behandelde nematoden ook gebruikt in een infectieproef (zie sectie 3.5).

4.4.2.1 Ontwikkeling en synthese van de siRNA's

Er werden twee verschillende siRNA's gemaakt, gericht tegen het UK8-gen. De sequenties werden gekozen conform de criteria weergegeven in sectie 3.4.1. De synthese van de siRNA's was succesvol, de concentraties gemeten met de nanodrop zijn weergegeven in tabel 4.5.

Tabel 4.5: Concentratie en kwaliteitsindicatie van de gesynthetiseerde siRNA's, gemeten met de nanodrop

	concentratie (ng/ μ l)	260/280
UK8A	859,1	1,86
UK8B	645,7	1,82

4.4.2.2 Behandeling van de nematoden

Vier batchen van nematoden werden behandeld: één werd geïncubeerd in siRNA-A, één in siRNA-B, één in een siRNA gericht tegen GFP en één in water. De laatste twee batchen gelden als controlebehandeling. Vervolgens werd elke batch gesplitst: een deel van de nematoden (2000 per behandeling) werd gebruikt voor infectie van rijstplanten, de rest (1750 nematoden per behandeling) werd gebruikt voor RNA-extractie, gevolgd door cDNA-synthese en Q-RT-PCR. De kwaliteit van het RNA was relatief slecht. De concentraties geëxtraheerd RNA zijn weergegeven in tabel 4.6.

Tabel 4.6: Concentraties RNA na extractie uit siRNA-behandelde nematoden (UK8)

RNA van nematoden behandeld met ...	concentratie RNA (ng/ μ l)
siRNA 8A	9,1
siRNA 8B	60,7
siRNA GFP	26,3
water	44,3

4.4.2.3 Controle van de kwaliteit van het cDNA

Omwille van de mindere kwaliteit van het RNA, werd eerst een test-PCR uitgevoerd (primers: EEF1A en Tubuline) om na te gaan of het cDNA van voldoende kwaliteit was om amplificatie toe te laten. Deze test bleek positief.

4.4.2.4 Q-RT-PCR

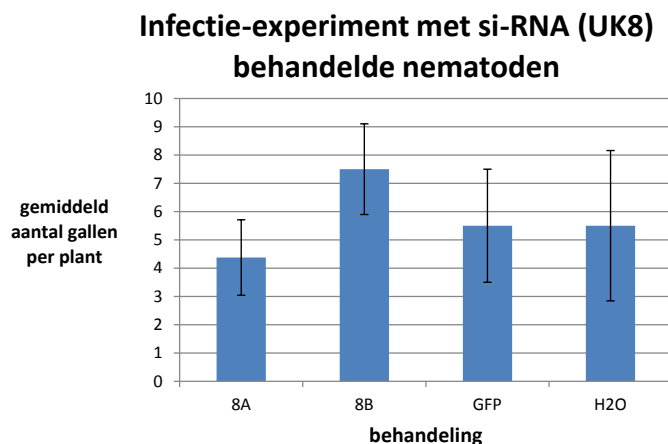
Voor de referentiegenen werden de primerparen GADPH, CYN5 en ACT2 gebruikt. Vergelijking van de expressie van UK8 in de twee controlestalen toonde geen opregulatie in één van beide stalen (zie bijlage G.1). Bijgevolg waren de data bruikbaar voor verdere analyse. De expressie van UK8 bleek niet beïnvloed door de siRNA-behandeling met siRNA-A. Behandeling met siRNA-B zorgde wel voor een opregulatie van de expressie van UK8 (zie bijlages G.2, G.3, G.4 en G.5 en tabel 4.7). Opnieuw was de *silencing* dus niet succesvol.

Tabel 4.7: Opregulatie van UK8 in nematoden behandeld met siRNA gericht tegen dit gen

Controle \ Staal	siRNA 8A	siRNA 8B
siRNA GFP	geen verschil in expressie	opgereguleerd (x2,9)
water	geen verschil in expressie	opgereguleerd (x2,1)

4.4.2.5 Infectie-experiment

Per siRNA-behandeling werden acht planten geïnfecteerd met de geïncubeerde nematoden (zie ook sectie 3.5). 24 uur na infectie werden de planten in een Hoagland-oplossing geplaatst om ervoor te zorgen dat er geen bijkomende infectie meer kon plaatsvinden. 8 dagen na infectie werd het aantal gallen dat op de planten geïnduceerd was geteld. De data zijn weergegeven in bijlage H.0.1. We zien dat het gemiddeld aantal gallen, geïnduceerd door de nematoden die een opregulatie van het UK8-gen vertoonden, hoger is dan het aantal geïnduceerd door de controlenematoden (Figuur 4.7). Dit wijst in de richting van een rol als effector voor het UK8-gen. Dit kan echter niet hard gemaakt worden, daar de gemiddelde aantallen gallen niet van elkaar verschillen op het 5%-significantieniveau. Dit blijkt uit de statistische analyse die werd uitgevoerd met SPSS. Er werd een Tukey-gecorrigeerde one-way ANOVA toegepast daar de data normaal verdeeld en homoscedastisch waren (zie bijlage H.0.2).



Figuur 4.7: Gemiddeld aantal gallen geïnduceerd door de nematoden behandeld met siRNA 8A, siRNA 8B, siRNA GFP en water met aanduiding van de standaardafwijking. De waarden zijn niet verschillend op het 5%-significantieniveau.

4.5 Zoeken naar interactiepartners

Er wordt gezocht naar interactiepartners a.d.h.v. een *yeast-2-hybrid assay* (zie sectie 3.6). Deze techniek maakt gebruik van gistcellen en reportergenen om interactie van een effector met eiwitten uit de gastheerplant te testen.

De gistcellen beschikken niet over een intact *URA3*-, *HIS3*-, *LEU2*- en *TRP1*-gen. Ze zijn dus niet in staat zelf respectievelijk uracil, histidine, leucine en tryptofaan te produceren. De gisten worden getransformeerd met twee plasmiden. Het ene plasmide bevat een plantegen (*prey*), het andere bevat het nematodegen

dat codeert voor de potentiële effector (*bait*). Beide plasmiden dragen ook een selectiemerker, de eerste vector draagt het *LEU2*-gen (Figuur 3.3), de andere het *TRP1*-gen (Figuur 3.4). Aan de hand van deze selectiemerkers kan gecontroleerd worden of beide plasmiden wel in de gistcellen aanwezig zijn. De gisten worden namelijk gekweekt op medium dat geen leucine en geen tryptofaan bevat. Enkel wanneer de juiste enzymen voor productie van deze twee aminozuren gecodeerd worden op de plasmiden (*LEU2* en *TRP1*), kunnen er kolonies groeien. Gistkolonies die groeien op medium zonder deze twee aminozuren bezitten dus zeker zowel het *bait*-plasmide als het *prey*-plasmide.

Om interactie na te gaan worden drie verschillende reporter genen gebruikt: *URA3*, *HIS3* en het *LacZ*-reporter gen. Deze kunnen pas geactiveerd worden als de transcriptiefactoren aanwezig zijn. Bij *yeast-2-hybrid* is de transcriptiefactor het geheel van de potentiële effector en de interagerende plantenmolecule. Enkel indien er interactie is kan het reporter gen worden afgeschreven en vertaald naar eiwit, wat zich dan fenotypisch uit in bijvoorbeeld blauwe verkleuring of groei (zie verder). Activatie van deze reporter genen wijst dus op interactie tussen de zogenaamde *bait* en *prey*. De *bait*-molecule is de potentiële effector UK8 en de *prey*-moleculen zijn alle mogelijke eiwitten die in de gastheerplant in contact kunnen komen met de effector.

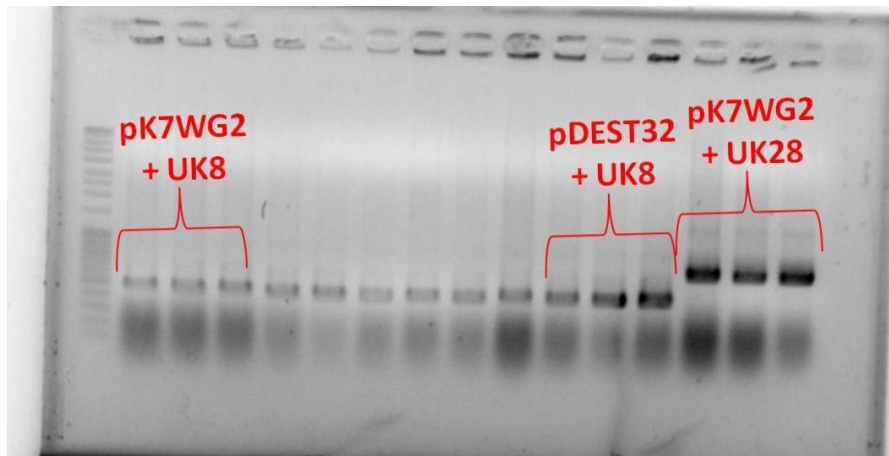
Gisten die bijvoorbeeld groeien op medium zonder tryptofaan, leucine en histidine zijn gisten die over de beide plasmiden beschikken en waarin bovendien transcriptie van het *HIS3*-reporter gen plaatsvindt (dankzij interactie tussen de potentiële effector en een molecule uit de bibliotheek van plantenmoleculen). Hetzelfde geldt voor het *URA3*-gen, een gen dat codeert voor een enzyme uit de biosynthese-*pathway* van uracil. Wanneer het *LacZ*-gen wordt afgeschreven, dan komt β -galactosidase tot expressie, dat in staat is X-gal (dat extern wordt voorzien tijdens de X-gal *assay*) om te zetten tot β -galactosidose, een blauw gekleurde stof.

4.5.1 Gateway klonering

Na de LR-reactie (zie sectie 3.6.1.3) werd het pDEST32 plasmide met UK8 (exclusief startcodon, inclusief stopcodon) via hiteschok getransformeerd in *E. coli*. Vervolgens werd via kolonie-PCR gecontroleerd of de gegroeide kolonies wel degelijk het construct bevatten. Deze test was positief voor alle drie de geteste kolonies (Figuur 4.8). Nadien werden de plasmiden opgezuiverd (zie sectie 3.6.1). De concentratie zuiver plasmide bedroeg 50 ng/ μ l.

4.5.2 Sequentie-analyse

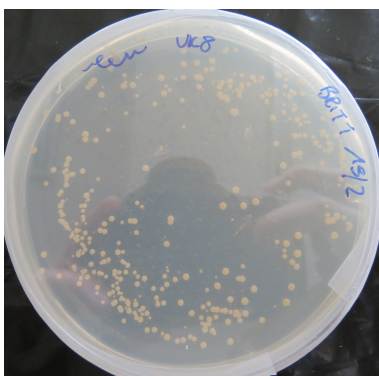
De plasmiden werden gesequeneerd om na te gaan of het effectorgen correct in de vector werd gekloneerd. Hierbij werd specifiek gelet op frameshifts. Het fragment moet in het juiste frame aanwezig zijn om correct tot expressie te kunnen komen in de gistcellen. Dit werd gecontroleerd, het fragment was correct gekloneerd.



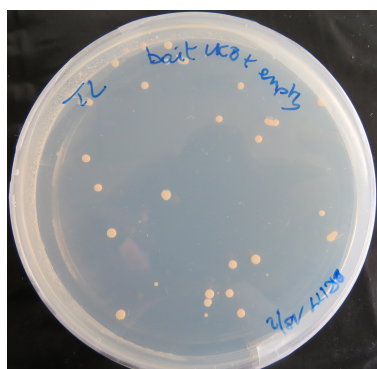
Figuur 4.8: Visualisatie van de PCR-producten van de kolonie-PCR op *E.coli* getransformeerd met verschillende plasmiden. Primers: attb1 en attb2 (zie sectie 3.6.1). Laantje 1: MassRuler ladder mix, laantjes 2-4: 3 kolonies getransformeerd met plasmide pK7WG2 + UK8 (inclusief start- en stopcodon) (428 bp), laantjes 11-13: 3 kolonies getransformeerd met plasmide pDEST32 + UK8 (exclusief start- en inclusief stopcodon) (425 bp), laantjes 14-16: 3 kolonies getransformeerd met plasmide pK7WG2 + UK28 (inclusief start- en stopcodon) (668 bp)

4.5.3 Transformatie van de giststam met *bait*-plasmide en *bait*-plasmide + leeg *prey*-plasmide

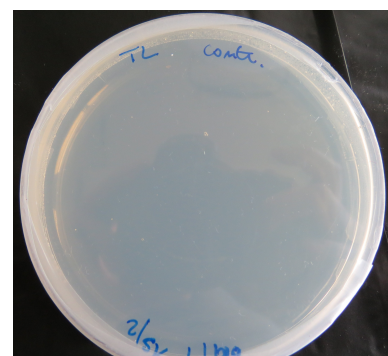
De transformatie werd uitgevoerd zoals beschreven in sectie 3.6.3. Na de transformatie werden de gistcellen uitgeplaat. Gistcellen die het *bait*-plasmide bevatten groeien op *-leu* medium (Figuur 4.9). Gistcellen die het *bait*-plasmide en het leeg *prey*-plasmide bevatten groeien op *-trp-leu* medium (Figuur 4.10). De negatieve controle die in dit protocol werd ingebouwd (transformatie in afwezigheid van plasmiden), werd uitgeplaat op *-trp-leu* medium. Hier is geen groei waar te nemen (Figuur 4.11). Deze uitplantingen tonen aan dat de transformatie geslaagd is.



Figuur 4.9: Transformatie van gist met *bait*-plasmide: uitplating op *-leu* medium, groei van gisten met *bait*-plasmide



Figuur 4.10: Transformatie van gist met *bait* en leeg *prey* plasmide: uitplating op *-trp-leu* medium, groei van gisten met *bait* en leeg *prey*-plasmide.



Figuur 4.11: Transformatie van gist: uitplating van negatieve controle op *-trp-leu* medium, geen groei.

4.5.4 Autoactivatie

Autoactivatie houdt in dat het *bait* (UK8) een reporter gen activeert zonder interactie met een *prey*. Indien autoactivatie optreedt kan niet verder gegaan worden met de bibliotheekscreening. Autoactivatie wordt getest door na te gaan of de reporter genen worden geactiveerd in gist die het *bait*-plasmide en het leeg *prey*-plasmide bevat (zie sectie 3.6.4).

Deze gistcellen groeiden op de platen zonder tryptofaan of leucine (*-trp-leu* medium) (Figuur 4.12), wat betekent dat ze de *bait*- en *prey*-plasmiden wel bezaten. Er werd geen groei waargenomen op medium zonder tryptofaan, leucine en uracil (*-trp-leu-uracil* medium) (Figuur 4.13), wat wijst op een niet-geactiveerd uracil-reporter gen. Het histidine-reporter gen wordt echter wel vrij gemakkelijk geactiveerd, ook zonder interactie. De beperkte groei op het *-trp-leu-his* medium kan beschouwd worden als afwezigheid van autoactivatie (Figuur 4.14). X-gal werd ook niet omgezet tot een blauw gekleurde product (Figuur 4.15). Hieruit kan besloten worden dat er geen autoactivatie is voor het gen UK8.

Op elke plaat worden ook drie referentiekolonies gegroeid. Een kolonie (S) die een *prey* en *bait* bezit die sterk interageren en dus sterke expressie van alle reporter genen veroorzaken. Een kolonie (W) die zwakke interactiepartners bevat en de reporter genen zwak activeert. Deze kolonie groeit wel op *-trp-leu-uracil* en *-trp-leu-his* medium, maar minder sterk dan de S-kolonie. Tot slot is er nog een derde referentiekolonie (NO), deze bevat een *prey* en *bait* die niet interageren. We verwachten voor deze kolonie dan ook niet groeit op *-trp-leu-uracil* en *-trp-leu-his* medium. De referentiekolonies groeiden zoals verwacht op de platen in figuren 4.12 t.e.m. 4.14. In de X-gal *assay* was er geen zwakke blauwverkleuring bij de zwakke interactie-kolonie (W) (Figuur 4.15), dit zou wel het geval moeten zijn.

4.5.5 Bibliotheekscreening

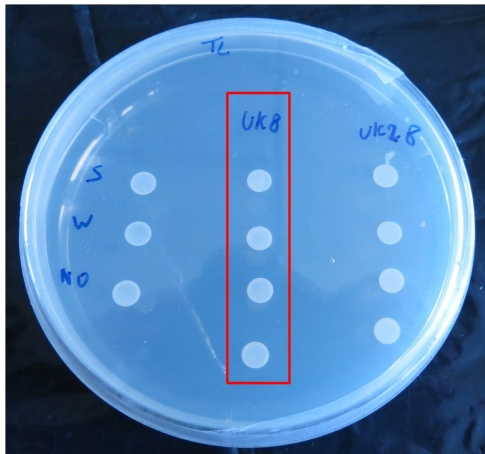
De bibliotheekscreening wordt uitgevoerd om te "vissen" naar interactiepartners van de effectors in de plant. Hiertoe wordt in gistcellen die het plasmide met het *bait* bevatten een *prey*-plasmide met planten-DNA binnengebracht via hiteschok (zie sectie 3.6.5). Indien het product van dit fragment interageert met de effector, wordt het histidine-reporter gen geactiveerd en zal de gistcel groeien op *-trp-leu-his* medium. Een klein aantal kolonies groeide op deze platen, maar trager dan verwacht.

4.5.6 Transformatie-efficiëntie

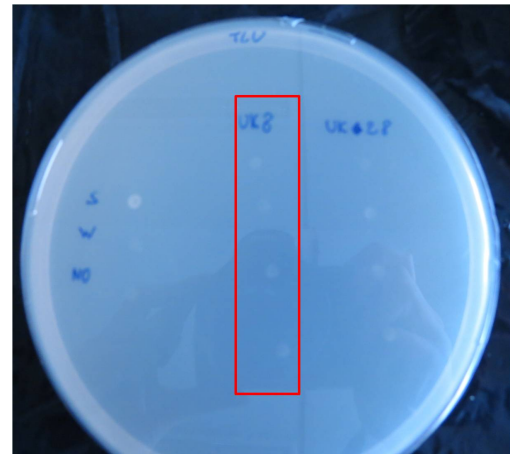
Er werd twee maal een 1/100 verdunning gemaakt uitgaande van 10 μ l staal. Van deze verdunning werd telkens 100 μ l uitgeplaat (zie sectie 3.6.5). Op deze platen werden 69 en 297 kolonies geteld. Dat levert een gemiddeld aantal kolonies op van $(69 + 297) * 0,5 = 183$. Bijgevolg is het aantal onafhankelijke kolonies gelijk aan:

$$183 \text{ kolonies} * 100 \text{ keer verdund} / 100 \mu\text{l uitgeplaat} * 397 \mu\text{l per plaat} * 14 \text{ platen} = 1017114 \text{ kolonies}$$

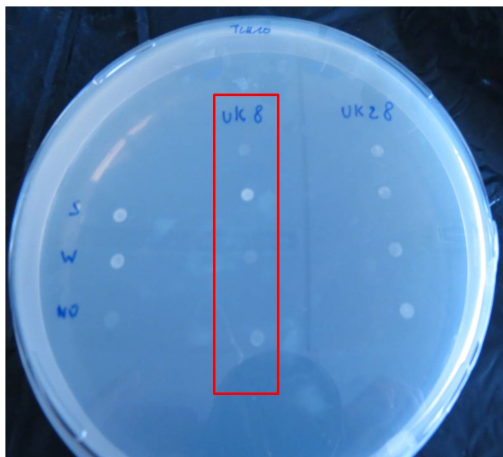
Dit wil zeggen dat er 1 017 114 gistcellen getransformeerd werden. Dit wordt beschouwd als een goed resultaat, met een reële kans op het vinden van een interactiepartner.



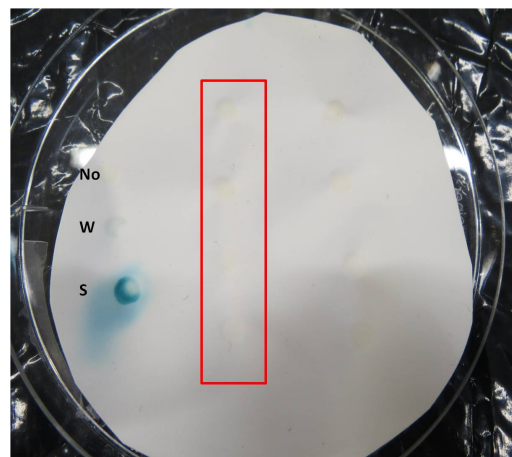
Figuur 4.12: Autoactivatietest van het gen UK8: groei op *-trp-leu* medium (positieve controle); S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie



Figuur 4.13: Autoactivatietest van het gen UK8: geen groei op *-trp-leu-uracil* medium; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie



Figuur 4.14: Autoactivatietest van het gen UK8: beperkte groei op *-trp-leu-his* medium; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie



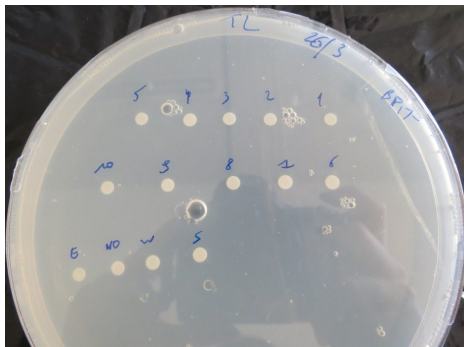
Figuur 4.15: Autoactivatietest van het gen UK8: geen blauwverkleuring in X-gal assay; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie

4.5.7 Verdere selectie

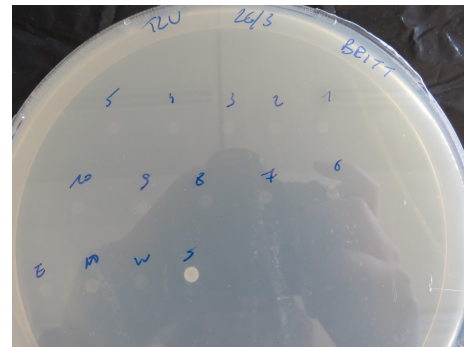
De bekomen kolonies werden verder getest op interactie tussen *bait* en *prey* door ook activatie van de andere reportergenen te testen. De kolonies worden opnieuw gegroeid op zowel *-trp-leu* medium (controle, alle kolonies worden verondersteld te groeien), *-trp-leu-his* medium (controle, de gisten zouden opnieuw op dit medium moeten groeien) als *-trp-leu-uracil* medium (om activatie van het uracil-reportergenen na te gaan). Ook wordt voor deze kolonies een X-gal assay opgezet. Naast de drie referentiekolonies, wordt nog een extra controle toegevoegd aan deze platen: gistcellen die het *bait*-plasmide en een leeg *prey*-plasmide bevatten. We verwachten geen groei van deze cellen. De uitkomst van deze test was onduidelijk, daarom werden de tien sterkst gegroeide kolonies een tweede maal aan deze test onderworpen.

De resultaten van deze tweede test zijn weergegeven in figuren 4.16 t.e.m. 4.19. Op *-trp-leu* medium, de controleplaat, groeiden alle kolonies (Figuur 4.16). Op figuur 4.17 waren de gistcellen niet gegroeid (ze hebben hetzelfde uitzicht als de referentiekolonie zonder interactiepartners). Kolonie nummer 9 heeft op figuur 4.18 hetzelfde uitzicht als de referentiekolonie met zwakke interactiepartners, dit kan wijzen op een zwakke interactie tussen de effector UK8 en de *prey* in die gistcellen aanwezig. Slechts bij activatie van minstens twee reporter genen wordt de kans op interactie hoog genoeg ingeschat om identificatie van de partner en verder onderzoek ter bevestiging van interactie uit te voeren. Op figuur 4.19 is echter duidelijk te zien dat er geen blauwverkleuring was voor kolonie 9, noch voor een van de andere kolonies. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de referentiekolonie met zwakke interactiepartners ook geen blauwverkleuring vertoonde in deze *assay*.

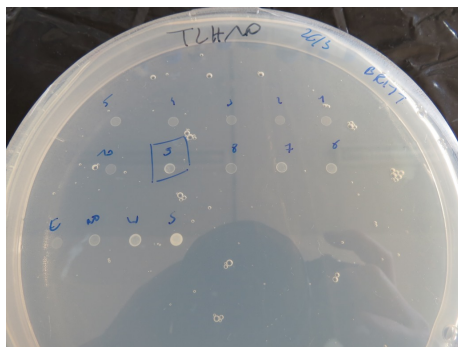
Daar geen enkele kolonie activatie van minstens twee reporter genen vertoonde, werd deze proef in dit stadium afgesloten. Deze screening heeft geen potentiële interactiepartners opgeleverd.



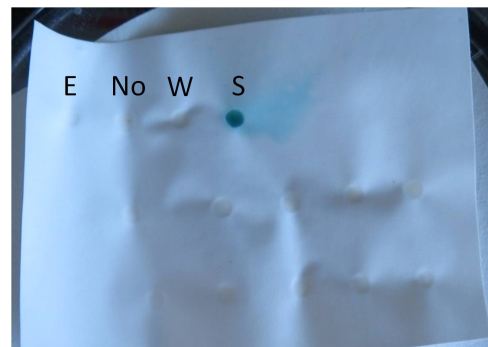
Figuur 4.16: Verdere selectie na bibliotheekscreening van het gen UK8: groei op *-trp-leu* medium (positieve controle); S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie, E = bait-vector + lege *prey*-vector



Figuur 4.17: Verdere selectie na bibliotheekscreening van het gen UK8: geen groei op *-trp-leu-uracil* medium; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie, E = bait-vector + lege *prey*-vector



Figuur 4.18: Verdere selectie na bibliotheekscreening van het gen UK8: enkel groei van kolonie nummer 9 op *-trp-leu-his* medium; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie, E = bait-vector + lege *prey*-vector



Figuur 4.19: Verdere selectie na bibliotheekscreening van het gen UK8: geen blauwverkleuring na een X-gal *assay*; S = sterke interactie, W = zwakke interactie, NO = geen interactie, E = bait-vector + lege *prey*-vector

4.6 Vergelijking van expressie van potentiële effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode

Het verzamelen van de verschillende stadia gebeurt door rijstplanten te infecteren en ze 24 uur na infectie in proefbuizen met Hoagland-oplossing te plaatsen (zie sectie 3.7.2). Nematoden kunnen in een waterige omgeving de wortels niet binnendringen. Op die manier is men dus zeker dat alle nematoden in de wortel aanwezig zijn ten alle tijde in hetzelfde levensstadium bevinden. Ze waren namelijk allemaal in het J2-stadium bij 24 uur na infectie en achteraf konden er geen jongere nematoden meer bijkomen. De gallen op de planten werden idealiter verzameld op 2 dagen na infectie (J2-stadium), 4 dagen na infectie (J3-stadium), 7 dagen na infectie (J4-stadium) en 10 dagen na infectie (adult stadium). De gallen werden verzameld zoals beschreven in sectie 3.7.3. Twee dagen na infectie waren er nog geen gallen zichtbaar en werden er worteltipjes verzameld. Vier dagen na infectie werden geen gallen verzameld omdat er onvoldoende beschikbaar waren.

4.6.1 RNA-extractie uit gallen

Uit de gallen werden de volgende concentraties RNA geëxtraheerd (zie sectie 3.7.4):

- staal 2 dagen na infectie: 8,7 ng/ μ l (slechte kwaliteit)
- staal 7 dagen na infectie: 78 ng/ μ l (goede kwaliteit)
- staal 10 dagen na infectie: 124,8 ng/ μ l (goede kwaliteit)
- staal ongeïnfecteerde wortels: 18,3 ng/ μ l (slechte kwaliteit)

1,8 μ g RNA werd gebruikt voor de cDNA-synthese (zie sectie 3.7.5).

4.6.2 Q-RT-PCR

De amplificatie in het staal van 2 dagen na infectie bleek niet succesvol (zie sectie 3.7.6). In tabel 4.8 wordt weergegeven welke genen in welke stalen tot expressie kwamen.

Tabel 4.8: Expressie van potentiële effectorgen in verschillende stalen

potentiële effector	staal 7 dagen na infectie	staal 10 dagen na infectie
UK8	expressie	geen expressie
UK28	geen expressie	geen expressie
UK50	expressie	expressie (x1,14)
UK52	expressie	expressie (x0,3)
UK67	geen expressie	geen expressie

De genen UK50 en UK52 kwamen in beide stalen tot expressie, m.b.v. de REST-software werd nagegaan hoe sterk de expressie tussen beide stalen verschilde. Voor de referentiegenen werden volgende primerparen gebruikt: EEF1A, CYN5 en Tubuline. Het blijkt dat de expressie van UK50 in het staal van 10 dagen na infectie hoger (factor 1,14) was dan in het staal van 7 dagen na infectie. UK52 kwam in het staal van 10 dagen na infectie dan weer lager (factor 0,3) tot expressie dan in het staal van 7 dagen na infectie. De expressie van UK50 verschilt slechts beperkt tussen beide stalen, de expressie van UK52 blijkt gevoelig te dalen tussen 7 en 10 dagen na infectie.

4.7 Onderdrukking van de plantenafweer

A.d.h.v. transiënte expressie van de potentiële effectors in tabak werd getest of deze in staat zijn de plantenafweer te onderdrukken.

4.7.1 Gateway klonering

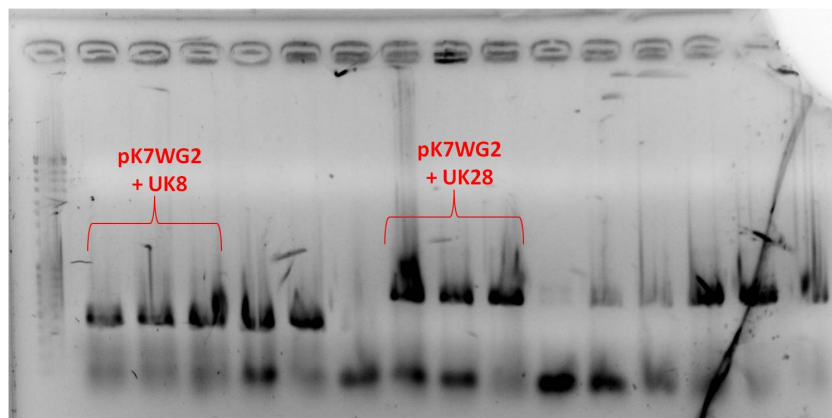
Na de LR-reactie (zie sectie 3.6.1.3) werden de pK7WG2 plasmiden met UK8 en UK28 (inclusief start- en stopcodon) via hiteschok getransformeerd in *E. coli*. Vervolgens werd via kolonie-PCR gecontroleerd of de gegroeide kolonies wel degelijk het construct bevatten. Deze test was positief voor alle geteste kolonies (Figuur 4.8). Nadien werden de plasmiden opgezuiverd. De concentraties zuiver plasmide bedroegen 73,2 ng/ μ l ($260/280 = 1,96$) en 135,8 ng/ μ l ($260/280 = 1,87$) voor UK8 en UK28 respectievelijk.

4.7.2 Sequentie-analyse

De plasmiden werden gesequeneerd om na te gaan of het effectorgen correct in de vector werd gekloneerd. Hierbij werd specifiek gelet op frameshifts. Het fragment moet in het juiste frame aanwezig zijn om correct tot expressie te kunnen komen tijdens de *immuno suppression assay*. Dit was inderdaad het geval.

4.7.3 Transformatie van *Agrobacterium*

De bekomen pK7WG2 plasmiden met UK8 en UK28 (inclusief start- en stopcodon) werden vervolgens via hiteschok in *Agrobacterium* gebracht. De PCR werd uitgevoerd met attb1 als F-primer en attb2 als R-primer (zie sectie 3.6.1). Deze transformatie was succesvol, zoals te zien in figuur 4.20.



Figuur 4.20: Visualisatie van de PCR-producten van de kolonie-PCR op *Agrobacterium* getransformeerd met pK7WG2-plasmiden. Primers: attb1 en attb2 (zie sectie 3.6.1). Laantje 1: MassRuler ladder mix, laantjes 2-4: 3 kolonies getransformeerd met plasmide pK7WG2 + UK8 (inclusief start- en stopcodon) (418 bp), laantjes 8-10: 3 kolonies getransformeerd met plasmide pK7WG2 + UK28 (inclusief start- en stopcodon) (652 bp).

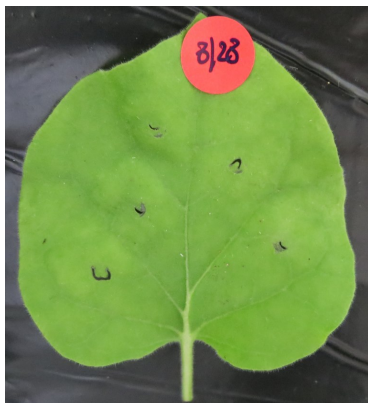
De pK7WG2 plasmiden met UK50 en UK52 (inclusief start- en stopcodon) waren reeds beschikbaar in *Agrobacterium*.

4.7.4 Immuno suppression assay

In dit experiment wordt ETI opgewekt in het blad van een tabaksplant door co-infiltratie van *Agrobacterium* getransformeerd met een avirulentiegen ($Avr3a^{KI}$) en *Agrobacterium* getransformeerd met een resistentiegen (R3a) (zie sectie 3.8). De gezamenlijke expressie en de interactie van deze twee genen zorgt ervoor dat de plant een immuunrespons opwekt, de hypersensitieve respons. Wanneer daar echter terzelfdertijd een effector tot expressie gebracht wordt die in staat is deze ETI te onderdrukken, dan zal een vertraagde of geen hypersensitieve respons worden opgewekt. Dit is suppressie van ETI.

4.7.4.1 Evaluatie

In de eerste plaats werd er nagegaan of de effectors op zich geen hypersensitieve respons veroorzaken. Als dit het geval is kan er geen onderdrukking van suppressie waargenomen worden. Hiertoe werden enkele bladeren geïnfiltrerd met negatieve controles, nl. *Agrobacteria* die enkel het effectorgen of enkel GFP of enkel Avr of enkel R bevatten. Wanneer de negatieve controles negatief zijn wordt ook uitgesloten dat de loutere infiltratie van getransformeerde *Agrobacteria* een hypersensitieve respons uitlokt. Op figuren 4.21 en 4.22 is duidelijk zichtbaar dat deze negatieve controles geen hypersensitieve respons opwekten. De andere responsen konden bijgevolg correct geïnterpreteerd worden.



Figuur 4.21: Transiënte expressie: negatieve controles; LINKS van boven naar onder: UK8, UK28, GFP; RECHTS van boven naar onder: Avr, R. Er is geen hypersensitieve respons waar te nemen.



Figuur 4.22: Transiënte expressie: negatieve controles; LINKS van boven naar onder: GFP, UK52, UK50; RECHTS van boven naar onder: Avr, R. Er is geen hypersensitieve respons waar te nemen.

In de volgende fase van deze *assay* werd suppressie van de hypersensitieve respons nagegaan door co-infiltratie van *Agrobacteria*. In elk blad werden positieve controles geïnfiltrerd: *Agrobacteria* met Avr, R en een lege vector werden samen geïnfiltrerd, net als *Agrobacteria* met Avr, R en GFP. We verwachten niet dat een lege vector of een GFP-sequentie in staat zijn de hypersensitieve respons te onderdrukken. Indien dit wel het geval is, zijn de resultaten van deze test onbetrouwbaar. Het kan echter wel zijn dat in sommige bladeren de hypersensitieve respons pas later zichtbaar wordt. In dat geval worden de positieve controles ook als negatief gescoord. Dit heeft geen invloed op de uiteindelijke p-waarde van de test aangezien er gezocht wordt naar een verschil tussen positieve controles en testinfiltraties. In het geval van een laat opkomende respons wordt het belang van positieve controles op elk blad duidelijk: zonder positieve controles

per blad zou foutief onderdrukking van de hypersensitieve respons geobserveerd worden. Suppressie van de hypersensitieve respons door potentiële effectors wordt nagegaan door co-infiltratie van *Agrobacteria* met Avr, R en een potentieel effectorgen. In figuur 4.23 wordt een blad weergegeven waarbij beide positieve controles inderdaad een hypersensitieve respons induceerden en waarbij zowel UK8 als UK28 niet in staat waren deze te onderdrukken. Het analoge voor UK50 en UK52 wordt weergegeven in figuur 4.24.



Figuur 4.23: Transiënte expressie: co-infiltratie; LINKS van boven naar onder: UK28, UK8; RECHTS van boven naar onder: GFP, lege vector. Er is een hypersensitieve respons waar te nemen.



Figuur 4.24: Transiënte expressie: co-infiltratie; LINKS van boven naar onder: UK52, UK50; RECHTS van boven naar onder: GFP, lege vector. Er is een hypersensitieve respons waar te nemen.

De scores (zie sectie 3.8.5) die werden toegekend aan elke infiltratie worden weergegeven in bijlage J en zijn samengevat in tabellen 4.9, 4.10, 4.11 en 4.12.

Tabel 4.9: Kruistabel van de scores uit de *immuno suppression assay* met UK8

staal * score Crosstabulation

Count		score		Total
		,00	1,00	
staal	GFP	5	39	44
	UK8	5	39	44
Total		10	78	88

Tabel 4.11: Kruistabel van de scores uit de *immuno suppression assay* met UK50

staal * score Crosstabulation

Count		score		Total
		,00	1,00	
staal	GFP	12	40	52
	UK50	12	40	52
Total		24	80	104

Tabel 4.10: Kruistabel van de scores uit de *immuno suppression assay* met UK28

staal * score Crosstabulation

Count		score		Total
		,00	1,00	
staal	GFP	5	39	44
	UK28	6	38	44
Total		11	77	88

Tabel 4.12: Kruistabel van de scores uit de *immuno suppression assay* met UK52

staal * score Crosstabulation

Count		score		Total
		,00	1,00	
staal	GFP	12	40	52
	UK52	12	40	52
Total		24	80	104

4.7.4.2 Statistische analyse

Zowel voor UK8, UK28, UK50 als UK52 werd geen significant verschil gevonden tussen de scores van de infiltratie met het effectorgen enerzijds en de scores van de infiltratie met GFP anderzijds. Hetzelfde geldt voor de lege vector in plaats van GFP. De p-waarden zijn weergegeven in tabel 4.13 en de output van de statistische analyse is terug te vinden in bijlagen J.2.1, J.2.2 en J.2.3. Enkel de output van de vergelijking met GFP als positieve controle wordt weergegeven in de bijlagen. Daar in alle gevallen beide positieve controles dezelfde score kregen, is deze output analoog voor de lege vector als positieve controle. Bijgevolg zijn de p-waarden voor beide positieve controles gelijk. De output van de statistische test van UK52 is ook niet weergegeven daar de dataset identiek is aan deze van UK50. Er is geen statistisch significante suppressie van ETI door de geteste potentiële effectors via de geteste *pathway*.

Tabel 4.13: p-waarden van de *Fisher's exact test* uitgevoerd ter vergelijking van de scores van positieve controles en testinfiltraties

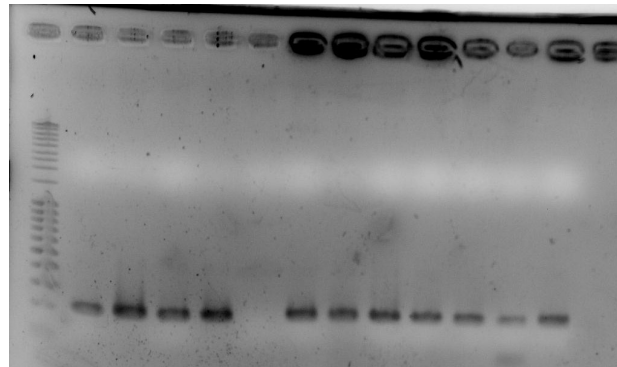
	GFP	lege vector
UK8	1,000	1,000
UK28	1,000	1,000
UK50	1,000	1,000
UK52	1,000	1,000

4.8 Expressie in rijst

Voor de transformatie van rijst werd er gebruik gemaakt van *Agrobacterium tumefaciens* om de nematodegenen in het plantengenoom te brengen (zie sectie 3.9). Deze *Agrobacteria* werden via *triparentale mating* getransformeerd met de pMBb7Fm21GW-UBIL vector die ofwel het UK50 ofwel het UK52 gen bevatte. Deze vectors waren reeds in het laboratorium voorhanden. Eerst werd er callus gevormd uit rijstzaden, vervolgens werd dit callus geïncubeerd met de getransformeerde *Agrobacteria*. De getransformeerde calli werden uitgeselecteerd op selectiemedium. Uit de calli die de selectie overleefden werden vervolgens scheutjes en wortels geregenereerd. De bekomen zaailingen werden opgegroeid tot volwassen planten en getest op de aanwezigheid van het nematodegen.

4.8.1 Transformatie van *Agrobacterium*

Agrobacterium werd getransformeerd met de reeds beschikbare plasmiden pMBb7Fm21GW-UBIL met UK50 of UK52 (beide zonder signaalpeptide). De bekomen kolonies werden getest op aanwezigheid van dit plasmide. De gebruikte primers zijn UK50-start-SP en UK50-attb2+stop (zie bijlage B). In figuur 4.25 is te zien dat 11 van de 12 geteste kolonies het plasmide met UK50 bevatten. Er werden ook kolonies gevonden die succesvol getransformeerd waren met het plasmide met UK52 (primers UK52-start-SP en UK52+stop (zie bijlage B)).



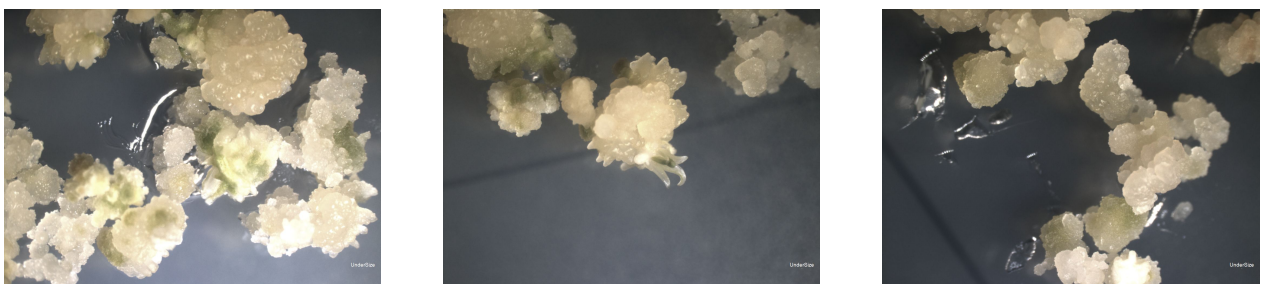
Figuur 4.25: Visualisatie van de PCR-producten van de kolonie-PCR op *Agrobacterium* getransformeerd met pMBb7Fm21GW-UBIL met UK50. Primers: UK50-start-SP (F-primer) en UK50-attb2+stop (R-primer) (212 bp). Laantje 1: MassRuler ladder mix, laantjes 2-13: kolonies getransformeerd met pMBb7Fm21GW-UBIL met UK50

4.8.2 Regeneratie

De getransformeerde *Agrobacteria* werden vervolgens gebruikt om calli te transformeren (zie secties 3.9.2.2 en 3.9.3). De laatste stap in het transformatieproces is de regeneratie (zie sectie 3.9.5). In figuren 4.26 en 4.27 worden beelden weergegeven van calli op regeneratiemedium. De groene kleur wijst op een beginnende differentiatie van callus tot scheutjes.



Figuur 4.26: Foto's van callus getransformeerd met het UK50 nematodegen dat reeds een week op regeneratiemedium groeit

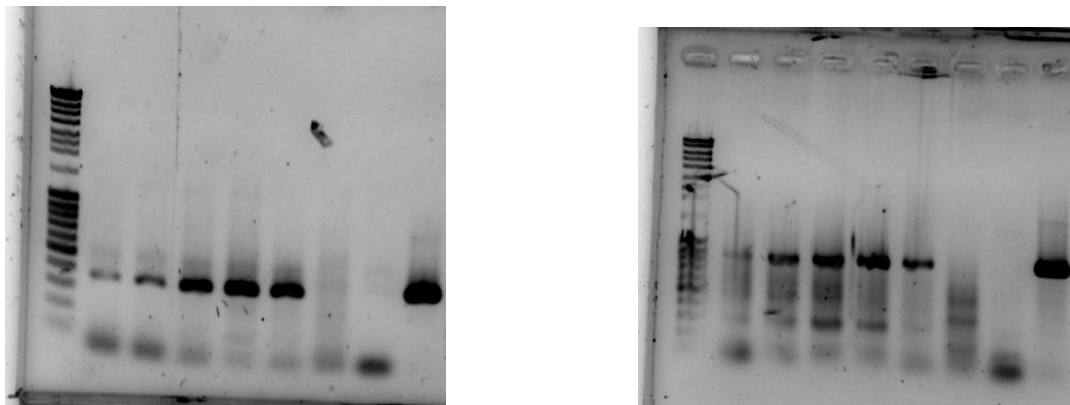


Figuur 4.27: Foto's van callus getransformeerd met het UK52 nematodegen dat reeds een week op regeneratiemedium groeit

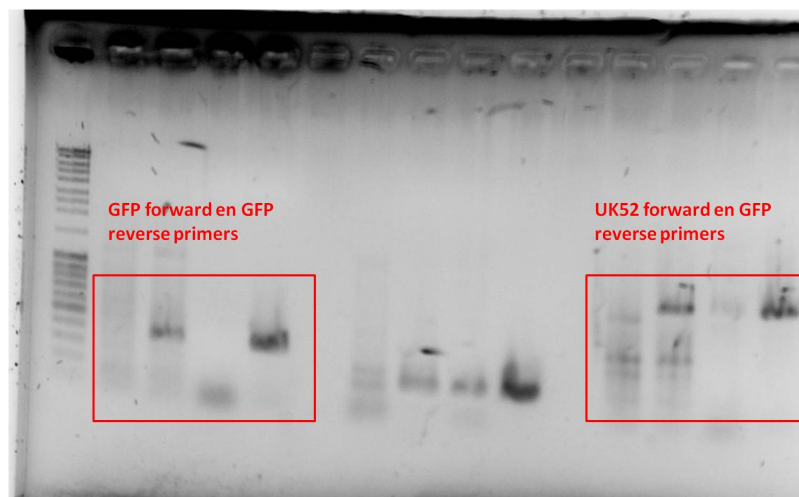
4.8.3 Testen van de aanwezigheid van het gen

Van elke lijn werd de sterkste plant getest op aanwezigheid van het nematodegen op DNA-niveau. In totaal werden tien planten getest. De resultaten van deze test waren echter moeilijk te interpreteren door de korte lengte van de geamplificeerde fragmenten. Er werd immers gebruik gemaakt van genspecifieke primers (zie bijlage B). Eén plant is na deze test doodgegaan. De resterende negen planten, afkomstig uit de events UK50-1, UK50-3, UK50-5, UK50-7, UK50-9, UK50-10, UK52-1 en UK52-2, werden nogmaals getest op het bezitten van het nematodegen UK50 of UK52. Ditmaal werden er twee verschillende primercombinaties gebruikt. Het eerste primerpaar bestond uit GFP-F (CACATGAAGCAGCACGACTT) en GFP-R (TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG), dit zijn primers die binden op de GFP-sequentie die op de vector aanwezig is (Figuur 3.6). De te verwachten fragmenten geamplificeerd door deze primers zijn 380 bp lang. Dit fragment is hetzelfde voor beide constructen daar het op de vector gelegen is die voor beide transformaties werd gebruikt. Het tweede primerpaar bestond uit een genspecifieke F-primer (UK50-F of UK52-F, zie bijlage B) en de GFP-R primer uit het eerste primerpaar. De te verwachten fragmenten zijn nu 826 bp en 847 bp lang voor UK50 en UK52 respectievelijk.

Uit figuur 4.28 blijkt dat enkel de plant uit event UK50-10 het UK50-gen niet bevat. In figuur 4.29 is te zien dat enkel de plant uit event UK52-1 het UK52-gen bezit. Er werden dus 5 transgene planten met het nematodegen UK50 en 1 transgene plant met het nematodegen UK52 gemaakt.



Figuur 4.28: Visualisatie van de PCR-producten na amplificatie van een fragment uit het DNA van de potentieel transgene rijstplanten (UK50). LINKS: Primers GFP-F en GFP-R (380 bp); RECHTS: Primers UK50-F en GFP-R (826 bp). Van links naar rechts op elke gel: MassRuler ladder mix, staal UK50-1, staal UK50-3, staal UK50-5, staal UK50-7, staal UK50-9, staal UK50-10, staal niet-getransformeerde plant (negatieve controle), vector gebruikt voor de transformatie (positieve controle).



Figuur 4.29: Visualisatie van de PCR-producten na amplificatie van een fragment uit het DNA van de potentieel transgene rijstplanten (UK52) met primers GFP-F en GFP-R (kader links) (380 bp) of UK52-F en GFP-R (kader rechts) (847 bp). Van links naar rechts in elk kader: staal UK52-1, staal UK52-2, staal niet-getransformeerde plant (negatieve controle), vector gebruikt voor de transformatie (positieve controle).

Hoofdstuk 5

Discussie

In dit onderzoek werden aanwijzingen verzameld die bijdragen tot het identificeren van effectors in het genoom van *Meloidogyne graminicola*. Er werd meer bepaald informatie verzameld over een aantal genen die volgens eerder onderzoek effectors zouden kunnen zijn. In dat onderzoek, voorafgaand aan deze thesis, werd op basis van een EST-project van *M. graminicola* een lijst gegenereerd van potentiële effectors [4].

In een eerste stap werden in dit eerdere onderzoek de EST's geassembleerd m.b.v. bio-informatica, zodat grotere gehelen werden gevormd uit verschillende fragmenten. Op die manier werden volledige afgeschreven genen gereconstrueerd. Genen die zeer laag tot expressie komen gaan mogelijk verloren tijdens de synthese van de cDNA-bibliotheek, of deze *reads* worden als weinig betrouwbaar beschouwd door het lage aantal moleculen, waardoor voornamelijk de sterkst tot expressie komende effectors vertegenwoordigd zijn. Gezien de fase waarin het onderzoek zich nog bevindt, is dit echter al een uitgebreide bron van potentiële effectors.

Uit deze geassembleerde transcripten werd in een volgende stap via bio-informatica een selectie gemaakt van potentiële effectors. Voorbeelden van criteria die hiervoor gehanteerd werden zijn het bezit van een signaalpeptide voor secretie, afwezigheid van een transmembraandomein en het ontbreken van homologie met genen uit niet-plantenparasitaire nematoden of andere organismen. Deze criteria zijn adequaat voor het selecteren van potentiële effectors. Het is namelijk geweten dat de meeste effectors over een signaalpeptide voor secretie beschikken om uit de faryngeale klierencellen te worden vrijgesteld. Door dit criterium te hanteren worden dus waarschijnlijk de meeste effectors opgepikt. Het voorspellen van signaalpeptiden gebeurt m.b.v. een bio-informatica-*tool*. Dit algoritme is wellicht niet feilloos en kan dus ook ten onrechte sequenties als signaalpeptide aanduiden of werkelijke signaalpeptiden niet herkennen. Er worden echter meerdere criteria gehanteerd, zodat ook genen zonder signaalpeptide die goed scoren op andere criteria geselecteerd worden. Effectors zijn per definitie eiwitten die het metabolisme van de gastheer beïnvloeden. Niet-parasitaire nematoden hebben bijgevolg geen effectors. Genen die sterke gelijkenis vertonen met niet-plantenparasitaire nematoden als *C. elegans* hebben vermoedelijk een andere functie, een functie die van belang is voor beide groepen nematoden. Op die manier wordt ook het gebruik van het tweede criterium geargumenteed.

Het tweede criterium werd in deze thesis nogmaals expliciet nagegaan voor de meest intensief bestudeerde genen. Twee genen (UK8 en UK28) vertoonden similariteit met EST's uit andere nematoden, allen van het geslacht *Meloidogyne*. In de literatuur wordt deze bevinding aanzien als een aanwijzing dat deze genen betrokken zijn bij de specifieke infectiemethode van wortelknobbelnematoden [85]. Het feit dat deze hits niet werden teruggevonden in de voorspelde eiwitten uit het genoom van *M. incognita*, hoewel ze wel

in EST's van deze nematode werden gevonden, is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat niet alle eiwitten correct zijn voorspeld.

5.1 Lokalisatie van expressie

De volgende stap in het onderzoek voorafgaand aan deze thesis was het lokaliseren van de plaats van effector-expressie in de nematode. Voor een aantal potentiële effectors op de lijst werd in-situ hybridisatie uitgevoerd. Zo werd aangetoond dat de genen UK28, UK50 en UK52 tot expressie komen in de faryngeale klieren (Figuren 5.1, 5.2 en 5.3) en dat UK8 in de amfiden tot expressie komt (Figuur 5.4) [4].



Figuur 5.1: Microscopisch beeld (300x) van *Meloidogyne graminicola* na in-situ hybridisatie met een probe tegen het gen UK28



Figuur 5.2: Microscopisch beeld (300x) van *Meloidogyne graminicola* na in-situ hybridisatie met een probe tegen het gen UK50



Figuur 5.3: Microscopisch beeld (300x) van *Meloidogyne graminicola* na in-situ hybridisatie met een probe tegen het gen UK52



Figuur 5.4: Microscopisch beeld (300x) van *Meloidogyne graminicola* na in-situ hybridisatie met een probe tegen het gen UK8

Tijdens deze thesis werden elf andere genen van de lijst van potentiële effectors op dezelfde manier getest. Expressie in de faryngeale klieren kon enkel aangetoond worden voor UK67. Het feit dat voor de meeste genen geen signaal werd bekomen kan op verschillende manieren verklaard worden. Het is mogelijk dat er tijdens het uitvoeren van het experiment iets is fout gelopen (bijvoorbeeld een niet-succesvolle hybridisatie of kleuring) of dat de expressie van deze genen afwezig of heel zwak is in het J2-stadium. Een andere mogelijke oorzaak voor de afwezigheid van signalen is de secundaire structuur van het mRNA die mogelijk te compact is om hybridisatie van de probe toe te laten.

In-situ hybridisatie is een beproefde methode die al in veel verschillende nematoden kon aantonen dat bepaalde effectors tot expressie komen in de faryngeale klieren. Onder andere werd op deze wijze aangetoond dat 10A06 in *H. schachtii* en *H. glycines* en drie nieuwe potentiële effectors in *M. incognita* in de faryngeale klieren tot expressie komen [60, 66, 85]. Elf sequenties die mogelijk tot het secretoom van *M. chitwoodi*

behoren, werden ook getest m.b.v. in-situ hybridisatie: acht sequenties merkten duidelijk en afgelijnd de faryngeale klieren en één werd gelokaliseerd in de tip van de staart, in de buurt van de fasmiden [86]. Ook in cystnematoden wordt deze techniek toegepast: in *Globodera rostochiensis* werd expressie in de faryngeale klieren van zes SPRYSEC-eiwitten aangetoond [87].

Expressie in de faryngeale klieren wordt beschouwd als een sterke indicatie voor secretie door het stylet. Dit is dan weer een sterke indicatie voor een effectorfunctie. Expressie in de faryngeale klieren wordt dus in de literatuur als een sterk argument voor effectoridentiteit beschouwd. Echter, dit zijn slechts indicaties en geen sluitende bewijzen. Desalniettemin wijst dit experiment in de richting van UK67 als effector. Ook expressie in de amfiden is een aanwijzing voor effectorfunctie (zie sectie 2.4.2). Op basis van de indicaties voor effectoridentiteit verzameld m.b.v. in-situ hybridisatie, werden de genen UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67 geselecteerd om verder te onderzoeken in deze thesis.

5.2 Silencing van potentiële effectors

In dit experiment werd getracht de genen UK50, UK52 en UK8 te *silencen* in de nematoden. Via een infectieproef kan dan gekeken worden of deze potentiële effectors noodzakelijk zijn voor een succesvolle infectie. Indien dit het geval is, is dat een sterke aanwijzing voor effectoridentiteit. Uiteraard is dit een "black box": men ziet enkel of, maar niet hoe dit gen een rol speelt in het infectieproces. Een dergelijke "black box"-methode is wel geschikt in deze fase van het onderzoek, waar het enkel de bedoeling is effectoridentiteit te onderzoeken. Het ontrafelen van de functie is dan de volgende stap. Voor de *silencing* van de genen werd gebruik gemaakt van RNAi. Dit is een techniek die gebruikt wordt om ervoor te zorgen dat het eiwit van een bepaald gen niet kan gemaakt worden (*silencing*). Het gen blijft wel in het genoom aanwezig, het betreft hier dus geen mutatie, maar het transcript wordt afgebroken. Hier werd gebruik gemaakt van siRNA's, maar *silencing* kan ook bekomen worden m.b.v. dsRNA.

De *silencing* was echter niet succesvol. Vooreerst was een aantal stalen onbruikbaar voor analyse aangezien de bijhorende controlestalen geen gelijk expressieniveau vertoonden. De oorzaak van deze sterk verschillende expressie is ongekend. Eventueel kan dit verklaard worden door de relatief slechte kwaliteit van het geëxtraheerde RNA (zie tabel 4.2). Voor de andere stalen werd er ofwel geen verschil in expressie genoteerd, ofwel werd de expressie van de genen in kwestie opgereguleerd in de behandelde stalen.

Zowel voor *silencing* van UK50, UK52 als UK8 werden siRNA's ontworpen volgens de criteria weergegeven in sectie 3.4.1. Het gebruik van deze criteria wordt algemeen aanvaard en gestaafd door aanbevelingen van gespecialiseerde firma's (vb. Invitrogen [88]). Men dient wel op te merken dat de secundaire structuur van het mRNA voorspeld werd a.d.h.v. computermodellen en dat deze voorspellingen dus misschien niet altijd waarheidsgetrouw zijn. Het criterium dat het GC-gehalte controleert tussen 30% en 50% wordt gehanteerd omdat uit de literatuur blijkt dat een laag GC-gehalte de meest stabiele siRNA's oplevert [89].

Op basis van de niet-succesvolle *silencing* zou men kunnen besluiten dat RNAi niet werkt in deze specifieke omstandigheden. Dit kan eventueel te wijten zijn aan een slechte ontvankelijkheid van *Meloidogyne graminicola* voor siRNA's. Uit de literatuur blijkt namelijk dat er grote verschillen zijn tussen stadia en soorten parasitaire nematoden qua gevoeligheid voor RNAi [90, 91]. Mogelijke oorzaken die hiervoor worden vermeld, zijn: (i) in species die niet *culturable* zijn kan men moeilijker RNAi uitlokken, (ii) nematoden

staan onder stress door het doorlopen van het *silencing*-protocol, waardoor veel RNAi wordt toegepast en de beschikbare RISC-complexen allemaal bezet zijn door de stress-reacties (saturatie) en (iii) er is weinig geweten over de mate waarin de eiwitten betrokken bij RNAi tot expressie komen, mogelijk zijn er op dit vlak grote verschillen tussen species. Het werd aangetoond dat verschillen in de RNAi-*pathway* niet aan de basis liggen van dit verschil in gevoeligheid [90].

Het is echter ook mogelijk dat de *silencing* in dit experiment wel succesvol was, maar dat de relatief slechte kwaliteit van het geëxtraheerde RNA niet toeliet dit te observeren met Q-RT-PCR. Aangewezen is om in de eerste plaats de RNA-extractie uit nematoden te optimaliseren, zodat de *silencing*-experimenten kunnen worden herhaald met RNA van goede kwaliteit. Het protocol dat voor dit experiment beschikbaar was, werd namelijk ontwikkeld voor extractie uit plantenmateriaal en niet uit nematoden. Het feit dat er bij extractie uit nematoden veel minder startmateriaal beschikbaar is dan bij planten, maakt dat dit protocol minder geschikt is. Wordt met een geoptimaliseerd protocol nog steeds geen *silencing* bekomen, dan kan men uitkijken naar een andere benadering voor de *silencing*.

Het gebruik van dsRNA i.p.v. siRNA is zo een andere mogelijkheid [36, 92]. Deze techniek werd reeds met succes toegepast op andere plantenparasitaire nematoden [3, 92, 93, 94, 95]. Echter, gebruik van dsRNA heeft ook nadelen. Zo werd beschreven hoe gebruik van *non-nematode-derived* lange dsRNA-moleculen het fenotype van wortelknobbelnematoden beïnvloedt, hoewel de dsRNA-moleculen bedoeld waren als controlebehandeling [96]. Dit zorgt ervoor dat effecten geobserveerd in niet-controlebehandelingen niet kunnen toegeschreven worden aan de *silencing*. In dat opzicht is het meer aangewezen het protocol met siRNA te optimaliseren, hoewel dit nog een vrij nieuwe techniek is. In de literatuur werd - waarschijnlijk voor het eerst - succesvolle en specifieke *silencing* in plantenparasitaire nematoden m.b.v. siRNA's beschreven in 2010 [97]. Het ging om *silencing* van een *FMRFamide-like peptide* in *M. incognita* (Mi-flp-18). Nadien werd bijvoorbeeld ook succesvolle *silencing* van een calreticulinegen, eveneens in *M. incognita*, gedemonstreerd. Deze *silencing* bleek de virulentie in infectieve juvenielen aan te tasten [98]. In dierenparasitaire nematoden werd *silencing* m.b.v. siRNA's met wisselend succes toegepast [99, 100].

Zoals reeds vermeld was de *silencing* niet succesvol, ook niet voor UK8. De expressie van dit gen werd opgereguleerd ten gevolge van de siRNA-behandeling. We zien dat deze nematoden, waarin het UK8-gen opgereguleerd was, in staat zijn een hoger gemiddeld aantal gallen te vormen op rijst in vergelijking met controlenematoden (Figuur 4.7). De gemiddelde aantallen gallen verschillen echter niet van elkaar op het 5%-significantieniveau. Hoewel deze resultaten wel doen vermoeden dat UK8 inderdaad voor een effector codeert, kan dit vermoeden dus niet gestaafd worden. Gezien de resultaten lijkt het toch zinvol om dit experiment te herhalen met een groter aantal planten, zodat de power van de statistische test verhoogt en hopelijk wel significante verschillen worden gevonden. Wel is het raadzaam om eerst de RNA-extractie uit nematoden en/of de *silencing* te optimaliseren. Een onderzoek gelijkaardig aan de infectieproef met UK8 toonde wel succesvolle in-vitro *silencing* van 16D10, die ook resulteerde in een minder efficiënte infectie en reproductie door *M. incognita*. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van dsRNA en de infectieproef werd uitgevoerd met *Arabidopsis thaliana* [3].

Een succesvolle RNAi biedt perspectieven voor een nieuwe generatie bestrijdingsmiddelen. Wanneer genen die essentieel zijn voor infectie van de plant of overleving van de nematode in de plant kunnen worden *gesilenced*, biedt dit veel mogelijkheden naar bijvoorbeeld het ontwikkelen van resistente, transgene planten

of een nieuw soort nematocide toe. Onderzoek toonde reeds aan dat dit praktisch mogelijk is: productie van 16D10 dsRNA in transgene *Arabidopsis* resulteerde in resistentie tegen *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* en *M. hapla* [3]. Infectie van *Arabidopsis* werd significant minder succesvol na *silencing* van de *H. schachtii* effector 4F01 in *Arabidopsis* m.b.v. dsRNA (er werden minder volwassen vrouwtjes geteld dan op controleplanten) [101]. Nog in *Arabidopsis* werd via dsRNA het gen 8D05 *gesilenced*, wat resulteerde in een vermindering van infectie met 90% [93].

5.3 Zoeken naar interactiepartners

Het vinden van een rijstproteïne dat met een potentiële effector interageert kan een grote stap vooruit zijn in de functie bepaling. Het zoeken naar zo een interactiepartner kan gebeuren in een *yeast-2-hybrid assay*. Uit de literatuur blijkt deze techniek zeer geschikt te zijn om een groot aantal planteneiwitten te testen op hun interactie met een potentiële effector. Verschillende interactiepartners werden reeds geïdentificeerd op deze manier. Bijvoorbeeld werden twee SCARECROW-like transcriptiefactoren gevonden die zouden interageren met 16D10 uit *M. incognita*. Dit werd bevestigd a.d.h.v. een co-immunoprecipitatie. Bij dit experiment werd echter niet uitgegaan van een volledige *Arabidopsis*-cDNA-bank, maar van een selectie van enkele genen die gemaakt werd op basis van een *two-hybrid* screen met tomaat-cDNA. Dit interactiepaar zou een rol kunnen spelen in inductie van reuzencellen [52]. In een ander onderzoek werd in een cDNA-bank van geïnfecteerde tomatenwortels TIP2 (*Tonoplast intrinsic protein 2*) als interactor van de *M. incognita* effector 8D05 geïdentificeerd [93]. Op basis van cDNA-banken van *Arabidopsis* geïnfecteerd met *H. schachtii* werden drie interactiepartners geïdentificeerd: SPDS2 interageert met de effector 10A06, pectinemethyltransferase 3 (PME3) interageert met het cellulose bindend proteïne (CBP) uit *H. schachtii* en de effector 4F01 interageert met een oxidoreductase uit de 2OG-Fe(II)-oxygenasefamilie [42, 66, 101]. Ook werd een interactor voor het SPRYSEC-19 eiwit uit *G. rostochiensis* gevonden via *yeast-2-hybrid* uitgevoerd met een cDNA-bibliotheek van gevoelige tomatenwortels. Dit resultaat werd ook bevestigd in een *pull-down assay* [87].

Yeast-2-hybrid maakt gebruik van drie verschillende reporter genen die enkel geactiveerd worden als er interactie is tussen het nematode-eiwit (*bait*) (in dit geval UK8) en de plantenmoleculen (*prey*). Een willekeurige selectie van eiwitten uit een cDNA-bibliotheek van geïnfecteerde rijstwortels werd getest. Een nadeel van de *yeast-2-hybrid* techniek is dat de interactiepartners naar de kern van de gistcel moeten getransloceerd worden, alvorens zij transcriptie van reporter genen kunnen teweegbrengen. Indien het eiwit betreft die geen nucleair lokalisatiesignaal bevatten, worden ze niet opgemerkt in de *assay*. Indien het om een sterke interactie gaat kan het volstaan dat één van beide interactiepartners een nucleair lokalisatiesignaal bevat [102].

Alvorens de zoektocht naar een interactiepartner kan starten, moet er eerst geverifieerd worden of de effector op zich geen reporter genen activeert. Dit kan als de effector fungeert als volledige transcriptiefactor met zowel DNA-bindings- als DNA-activatiedomein of wanneer hij interageert met een andere moleculen in de gist dan de plantenmoleculen. Dit wordt gecontroleerd in een autoactivatietest, wat inhoudt dat expressie van de drie reporter genen wordt getest met een leeg *prey*-plasmide. Ondanks de beperkte groei op *-trp-leu-his* medium in de autoactivatietest in dit experiment, kan toch besloten worden dat er geen autoacti-

vatie is van UK8. Het histidine-reportergen wordt namelijk vrij gemakkelijk geactiveerd (autoactivatie), ook wanneer er geen interactie is. Verder ontbreekt een lichtblauwe kleur bij de referentiekolonie met zwakke interactiepartners (W) in de X-gal *assay* in deze test. Op die manier is deze X-gal *assay* niet volledig sluitend; het is mogelijk dat er zwakke autoactivatie van UK8 optreedt, maar dat deze niet zichtbaar geworden is. Dit probleem werd in het verleden al vaker gesignaleerd in het labo. Na het uitvoeren van dit experiment heeft men gezocht naar oplossingen voor dit probleem. Intussen heeft men wel al blauwverkleuring van de zwakke interactiepartners (W) geobserveerd. Dit succes zou kunnen te wijten zijn aan het gebruik van een vers bereide X-gal oplossing (zoals voorgeschreven onder 3.6) in plaats van een stockoplossing.

De transformatie-efficiëntie werd berekend op basis van uitplatingen van de 1/100 verdunning en bedroeg ongeveer een miljoen. De waarde bekomen voor dit experiment is relatief goed in vergelijking met waarden uit de literatuur. Er worden waarden gerapporteerd van ongeveer 15 miljoen transformanten in totaal (d.i. na meerdere experimenten waarbij in totaal drie cDNA-banken werden gescreend) [42, 66], maar ook van slechts 0,2 miljoen transformanten [87]. Toch werden in dit laatste onderzoek al vijf cDNA-fragmenten gevonden die interageerden met één van de drie *bait*s [87]. Er dient wel opgemerkt te worden dat niet elke getransformeerde kolonie ook toelaat een nieuwe plantensequentie te testen. De fragmenten die in de *prey*-vectors worden gekloneerd zijn immers afkomstig uit een cDNA-bank waar sterk tot expressie komende sequenties meer in vertegenwoordigd zijn dan zwak tot expressie komende sequenties. Hoe zwakker de interactiepartner van de effector in de plant tot expressie komt, hoe moeilijker hij te vinden is m.b.v. deze techniek. Bovendien bevat ongeveer één derde van de *prey*-plasmiden geen functionele eiwitsequentie doordat het cDNA-fragment niet altijd in het juiste frame wordt gekloneerd.

Tijdens de bibliotheekscreening groeiden de getransformeerde kolonies trager dan verwacht. Dit deed reeds vermoeden dat er geen activatie van het *HIS3*-reportergen zou zijn. Echter, een aantal kolonies groeide toch sterker dan de achtergrond en werd daarom toch meegenomen voor verdere selectie. Tijdens deze verdere selectie werd één kolonie geïdentificeerd die zwakke activatie van het *HIS3*-reportergen leek te veroorzaken. Doordat de andere reportergenen niet geactiveerd werden, werd de *prey* in die kolonie toch niet als mogelijke interactiepartner beschouwd. Er wordt namelijk enkel rekening gehouden met een mogelijke interactie wanneer twee van de drie reportergenen geactiveerd worden. Echter, men zou kunnen stellen dat een zwakke interactie ook in de X-gal *assay* niet verwacht werd blauwverkleuring te vertonen, aangezien de referentiekolonie met zwakke interactiepartners dit ook niet deed (Figuur 4.19). Het *URA3*-reportergen wordt over het algemeen enkel door sterke interactors geactiveerd en dus kan men stellen dat ook hier de potentiële zwakke interactie in kolonie 9 niet zichtbaar geworden is. Inderdaad, het uitzicht van kolonie 9 op de *-trp-leu-uracil* plaat is hetzelfde als van de W-kolonie. Toch werd met deze kolonie niet verder gewerkt omdat de aanwijzingen voor een zwakke interactie onvoldoende werden geacht om het tijds- en arbeidsintensieve vervolg van de procedure aan te vatten.

Het is niet ongewoon dat er bij deze test geen interactiepartners gevonden worden. *Yeast-2-hybrid* is een screening waarbij in de pool van alle tot expressie komende plantengenen willekeurig een aantal genen worden geselecteerd. De kans op aanwezigheid van een interactiepartner in deze willekeurige selectie is eerder klein. Het vinden van een interactiepartner berust dus grotendeels op toeval. Het kan wel een grote stap voorwaarts betekenen in de functie bepaling van de potentiële effector en dus is het de moeite waard om dit tijds- en arbeidsintensief protocol met kleine slaagkans toch uit te voeren. Als volgende stap in de

zoektocht naar interactiepartners van UK8 lijkt het daarom nuttig dit *yeast-2-hybrid* experiment te herhalen. Een groot aantal nieuwe potentiële interactors zal dan getest worden. Een ander experiment dat interactiepartners kan vinden en de *yeast-2-hybrid* resultaten kan bevestigen is een *pull down assay*. In een *pull down assay* wordt het *bait* gemerkt en geïmmobiliseerd op een dragermateriaal. Vervolgens wordt dit materiaal geïncubeerd met een weefselysaat dat planteneiwitten bevat. De interactiepartners worden weerhouden op het dragermateriaal wanneer alle niet-interagerende moleculen worden weggewassen [103].

5.4 Vergelijking van expressie van potentiële effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode

Nog een manier om aanwijzingen te verzamelen over de functie van bepaalde genen is in kaart te brengen wanneer tijdens de levenscyclus ze sterk, zwak of niet tot expressie komen. Een effector die sterk tot expressie komt in het J2-stadium is wellicht betrokken bij het infectieproces, een effector die in latere juveniele stadia sterk tot expressie komt kan bijvoorbeeld betrokken zijn bij het afweren van de plantenimmuunrespons of bij het onderhouden van de reuzencellen. In nog latere stadia komen effectors tot expressie die zorgen voor maturatie en onderhoud van de voedingsplaats. Er werden nematoden uit verschillende levensstadia verzameld en er werd getracht de expressie van UK8, UK28, UK50, UK52 en UK67 te kwantificeren.

Twee dagen na infectie zijn er meestal nog maar weinig (kleine) of zelfs geen gallen zichtbaar. Het laatste was in dit experiment het geval. Daar infectie vaak via de worteltipjes gebeurt en in geval van *Meloidogyne graminicola* de gallen zich ook vaak daar ontwikkelen, werden de worteltipjes verzameld in een poging toch J2-juvenielen te bekomen. De infectie bleek niet erg succesvol, aangezien na 4 dagen nog steeds weinig gallen zichtbaar waren. Het verzamelen van J3-nematoden werd overgeslagen wegens te weinig gallen. Ook op 7 en 10 dagen na infectie waren er minder gallen zichtbaar dan verwacht. Het aantal ingezamelde gallen was dus erg klein. Daarbovenop in beschouwing genomen dat er in elke gal een overvloed planten-RNA en slechts een klein aandeel nematoden-RNA aanwezig is, maakt het moeilijk om amplificatie van nematoden-cDNA te verkrijgen in Q-RT-PCR. De RNA-extractie op zich was geslaagd en leverde voldoende RNA van goede kwaliteit op (behalve voor het staal van 2 dagen na infectie, op het moment dat enkel worteltipjes en geen gallen werden verzameld). Dit is echter geen garantie op amplificatie van de effectorgenen, gezien het kleine aandeel nematoden-RNA. Toch blijkt amplificatie van nematodegenen in totaal cDNA gemaakt uit geïnfecteerd wortelweefsel mogelijk. Bijvoorbeeld werden sojawortels verzameld op 2, 5 en 10 dagen na infectie met *H. glycines* en hieruit werd RNA geëxtraheerd. Men was in staat om a.d.h.v. Q-RT-PCR op deze stalen resultaten van een andere analyse te bevestigen [104].

UK8 komt volgens dit experiment tot expressie in het J4-stadium en niet in het adulte stadium. Het feit dat er een signaal werd gedetecteerd bij in-situ hybridisatie, wil zeggen dat het ook in het J2-stadium tot expressie komt (Figuur 5.4). Het speelt dus mogelijk een rol in alle juveniele stadia, bijvoorbeeld in onderhoud van de voedingsplaats. Het is mogelijk dat de expressie in het adulte stadium niet detecteerbaar was door de kleine concentratie nematoden-cDNA in de totale hoeveelheid cDNA. Men zou dan kunnen aannemen dat UK8 tijdens het hele leven van de nematode tot expressie komt. In dat geval is een functie in verdediging tegen plantenafweer waarschijnlijk.

Voor UK28 en UK67 werd geen expressie gedetecteerd, dit kan gelegen zijn aan de kleine hoeveelheid

beschikbaar cDNA of aan het feit dat deze genen enkel in de migrerende stadia (J2) tot expressie komen. Expressie in dat stadium werd aangetoond in in-situ hybridisatie-experimenten (Figuur 5.1 en sectie 4.3). In het laatste geval spelen UK28 en UK67 wellicht een rol in de infectie van de plant of het initiëren van een *feeding site*.

Expressie van UK50 en UK52 kon wel worden aangetoond in zowel het J4- als het adulte stadium. De expressie van UK50 was lichtjes hoger in het adulte stadium (x1,14), maar niet in die mate dat dit wijst op een specifieke functie in dat stadium. De expressie van UK52 daalt in het adulte stadium: de expressie in stadium J4 is meer dan 3 keer hoger dan bij adulten. Uit in-situ hybridisatie in J2-nematoden weten we ook dat zowel UK50 als UK52 tot expressie komen in dat stadium (Figuren 5.2 en 5.3). Vermoedelijk komen beide genen doorheen de hele levenscyclus tot expressie. Bijgevolg kunnen ze een functie hebben in het afweren van de plantenimmuunrespons.

Bij het formuleren van deze hypothesen moet rekening gehouden worden met het feit dat afwezigheid van expressie niet gegarandeerd is wanneer er geen amplificatie van cDNA is (ten gevolge van de kleine concentratie nematode-cDNA). Men moet ook in het achterhoofd houden dat er geen stalen werden genomen van J3-nematoden. Men kan alleen vermoeden dat expressie tijdens de gehele levenscyclus plaatsvindt. Het lijkt zinvol om dit experiment te herhalen met meer planten. Bij een beter geslaagde infectie zal er meer nematoden-RNA beschikbaar zijn. Men zou er ook goed aan doen het protocol voor nematoden-RNA-extractie uit gallen te optimaliseren. Dit kan bijvoorbeeld door verschillende RNA-extractiekits te testen. Een alternatief is om de gallen niet als geheel te gebruiken in de RNA-extractie, maar om de nematoden eerst uit de gallen te dissecteren. Ondanks het feit dat dit zeer tijds- en arbeidsintensief is, werd het toch al toegepast. De expressie van *heat shock protein 90* in *Meloidogyne artiellia* werd vergeleken tussen eitjes, J2, J3, J4 en adulte stadia. De nematoden werden bekomen op verschillende manieren, waaronder extractie uit grond en dissectie uit gallen (J3, J4 en adulte vrouwtjes). Dit gen bleek in alle stadia hoog tot expressie te komen [105]. Er zijn nog andere technieken mogelijk om nematoden te isoleren uit wortelweefsel. Zo werd ook al gebruik gemaakt van de RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) om RNA te extraheren uit 50 mg nematodenweefsel dat geïsoleerd werd door het voorzichtig mixen van tomatenwortels en het uitzeven van de nematoden. In dit onderzoek werd aangetoond dat de expressie van de *M. incognita* effector 8D05 het hoogst was in het parasitair J2-stadium. Dit is het stadium waarin inductie van de reuzencellen gebeurt [93].

5.5 Onderdrukking van de plantenafweer

In dit experiment werd gekeken of de potentiële effectors UK8, UK28, UK50 en UK52 in staat zijn de hypersensitieve respons die veroorzaakt wordt door Avr3a^{KI} en R3a te onderdrukken. Indien dit het geval is, dan is dit een indicatie voor een rol van het geteste gen als effector, meer bepaald één die interfereert met de plantenafweer (zie sectie 2.4.3). Dit wordt getest m.b.v. een tabaksinfiltratieproef. Na verloop van tijd wordt de hypersensitieve respons in de positieve-controlebehandelingen zichtbaar op de tabaksbladeren en kan deze vergeleken worden met de respons in aanwezigheid van de potentiële effectors. Op nagenoeg alle bladeren was de hypersensitieve respons even sterk aanwezig bij de effectors als bij de positieve controles. Er kan dus besloten worden dat geen van de vier geteste genen in staat is deze ETI-pathway te onderdrukken. Geen informatie omtrent hun functie werd dus bekomen.

Bij deze werkwijze valt op te merken dat de hypersensitieve respons wordt uitgelokt door één welbepaalde ETI-*pathway*, nl. deze van Avr3a^{KI} en R3a. Er zijn echter nog veel andere ETI-*pathways* die door andere Avr-genen worden aangeschakeld. Indien de effectors daar op inwerken, zal hun functie via dit experiment niet zichtbaar zijn. De Avr- en R-genen die hier werden gebruikt zijn respectievelijk afkomstig uit *Phytophthora infestans* en de aardappelplant. Het is niet mogelijk Avr- en R-genen van *Meloidogyne graminicola* zelf en rijst te gebruiken, aangezien die nog niet gekend zijn. Avr-genen uit cystnematoden werden reeds getest, maar de hypersensitieve respons was minder betrouwbaar dan bij de hier gebruikte Avr- en R-genen, hij was zwakker en onregelmatig zichtbaar. De Avr- en R-genen die in dit experiment werden gebruikt om een hypersensitieve respons uit te lokken werden ook al in andere onderzoeken gebruikt. Bijvoorbeeld was UBI-EP uit de cystnematode *Globodera pallida* in staat ETI veroorzaakt door Avr3a^{KI} en R3a te onderdrukken [106]. In een ander onderzoek werd de mogelijkheid onderzocht dat de SPRYSEC-19 effector uit *Globodera rostochiensis* resistentie in planten onderdrukt. Deze effector is inderdaad in staat om sommige ETI-*pathways* te onderdrukken. Suppressie werd waargenomen bij ETI uitgelokt door Gpa2/RBP1 en door Rx1/cp106, maar niet door Cf4/Avr4, Cf9/Avr9, R3a/Avr3a^{KI}, Rpi-blb2/AvrBlb2 of BS4/AvrBS4 [46].

5.6 Expressie in rijst

Transgene planten die potentiële effectors tot expressie brengen kunnen gebruikt worden voor functionele studie van de effectors. Zo kan er bijvoorbeeld onderzocht worden of de aanwezigheid van de effector in kwestie een invloed heeft op de plantfysiologie of -morfologie. Via Q-PCR kan de expressie van plantengenen in kaart gebracht worden om na te gaan of de aanwezigheid van de effector bepaalde genen en eventueel bepaalde *pathways* opreguleert of onderdrukt. Ook kan men een infectietest opzetten die kan uitwijzen of de effector de plant gevoeliger maakt. Voor deze toekomstige experimenten is het een voordeel als de effectorgenen getransformeerd worden in het gewas, rijst, i.p.v. in de modelplant *Arabidopsis thaliana*. Transformatie van het gewas heeft als voordeel dat de resultaten direct interpreteerbaar zijn en dat de effector zeker zijn effect kan uitoefenen via de natuurlijke, volledig intacte *pathway*. Ook de resultaten van o.a. infectieproeven en monitoring van plantengenen zijn waardevoller. In geval van *M. graminicola* is werken met *Arabidopsis* zelfs geen optie aangezien deze nematode niet in staat blijkt deze modelplant te infecteren. Onderzoek naar effectors van andere wortelknobbelnematoden gebeurt wel vaak op *Arabidopsis*. Bijvoorbeeld is er een onderzoek waarin een homoloog van de 10A06 effector in de cystnematode *Heterodera schachtii* tot expressie werd gebracht in deze modelplant [66]. Infectieproeven toonden duidelijk aan dat expressie van deze effector de plant gevoeliger maakte voor infectie. Ook veranderde de morfologie van de plant. De transgene planten konden in dit onderzoek ook dienen om de via *yeast-2-hybrid* ontdekte interactiepartners te monitoren en het effect van de interactie op de *pathways* in de plant te bekijken. Op die manier speelden de transgene *Arabidopsis*-planten een belangrijke rol in het blootleggen van een (nieuw) werkingsmechanisme van effectors [66]. In een ander onderzoek werd gebruik gemaakt van transgene *Arabidopsis* en transgene *hairy roots* van tabak om het effect van expressie van 16D10 na te gaan. Deze effector bleek wortelgroei sterk te stimuleren, waarna men m.b.v. *yeast-2-hybrid* twee SCARECROW-like transcriptiefactoren als potentiële interactors kon identificeren [52]. Expressie van de *M. incognita* 8D05 effector in *Arabidopsis* had geen zichtbare effecten op de wortelgroei, maar zorgde wel voor versnelde scheutgroei en vervroegde bloei

[93]. Echter, er zijn ook reeds studies waarin economisch belangrijke gewassen getransformeerd werden. Bijvoorbeeld werd een *M. javanica* effector tot expressie gebracht in *hairy roots* van soja, een gastheerplant van *M. javanica* en een economisch belangrijk gewas [50, 107]. De morfologie van de transgene wortels werd bestudeerd, alsook de histologie. Deze informatie, in combinatie met het effect van externe IAA toediening aan de transgene wortels leverde nieuwe inzichten in het werkingsmechanisme van de effector in kwestie (*Meloidogyne javanica* chorismaatmutase 1) [50].

Tijdens deze thesis werden transgene rijstplanten gegenereerd m.b.v. *Agrobacterium tumefaciens*. Zes planten werden bekomen met de potentiële effector UK50 en slechts één plant die de potentiële effector UK52 bevat. De transformatie-efficiëntie was relatief goed voor UK50, maar voor UK52 toch bijzonder laag. Doordat voor de transformatie van de rijstplanten gebruik werd gemaakt van *Agrobacterium*, is de plaats van het insert in het rijstgenoom volledig willekeurig. Bijgevolg is de kans relatief groot dat het insert in een zone terecht komt waar het laag tot expressie komt, bijvoorbeeld in heterochromatine. De analyse van de expressie van het gen dient dus zeker nog uitgevoerd te worden. De sterkte van expressie kan worden bepaald in een Q-RT-PCR met de huishoudgenen van de plant als referentiegenen. De kans dat het insert op een goede plaats in het genoom is geïnsereerd, is klein. Hoe meer getransformeerde planten, hoe groter de kans op succes. Helaas is het aantal planten hier beperkt.

De volgende stap is om met deze transgene planten een T1-generatie te maken via zelfbestuiving. De ouderplanten zijn allemaal heterozygoot (insertie van het gen zal niet op de beide homologe chromosomen op dezelfde plaats gebeurd zijn). De T1-generatie zal dus segregeren. De bedoeling is om homozygote planten te verkrijgen, planten met één en hetzelfde insert op elk chromosoom. Een *Southern blot* analyse kan informatie geven over het aantal inserts. De homozygote planten kunnen in de toekomst gebruikt worden voor functionele studie van UK50 en UK52.

5.7 Verder onderzoek

Met de hier beschreven technieken kan al veel nuttige informatie worden verzameld. Een bijkomende techniek die in de toekomst ook kan bijdragen tot dit onderzoek is subcellulaire lokalisatie van de potentiële effectors in planten. Er zijn al enkele voorbeelden gekend van onderzoeken die m.b.v. deze techniek informatie verzameld hebben over de effectoridentiteit en -functie van bepaalde eiwitten. Bijvoorbeeld werd m.b.v. een confocale microscoop de subcellulaire locatie van het fusieproteïne UBI-EP-GFP bepaald. De UBI-EP effector uit *G. pallida* bleek zich in het cytoplasma te positioneren [106]. 10A06, een effector van *H. schachtii*, werd als fusieproteïne met zowel GFP als GUS gelokaliseerd in het cytoplasma van epidermale ui-cellen (*Allium cepa*) [66]. Ook ontdekte men dat CBP (uit *H. schachtii*) waarschijnlijk eerst accumuleert in het cytoplasma. Nadien wordt het dan vermoedelijk geëxporteerd naar de apoplast door interactie met het *Arabidopsis* pectinemethylesterase (PME3). Ook in dit onderzoek werd gebruik gemaakt van fusieproteïnen die zowel GFP als GUS bevatten en van transiënte expressie in epidermale cellen van ui [42].

5.8 Overzicht

In Tabel 5.1 wordt een overzicht gegeven van alle uitgevoerde experimenten en de voornaamste resultaten.

Tabel 5.1: Overzicht

	UK 8 <i>(Expressie in amfiden)</i>	UK 28 <i>(Expressie in faryngeale klieren)</i>	UK 50 <i>(Expressie in faryngeale klieren)</i>	UK 52 <i>(Expressie in faryngeale klieren)</i>	UK 67 Expressie in faryngeale klieren
Lokalisatie van expressie					
<i>Silencing</i>	8B opgereguleerd		Opgereguleerd	Experiment niet gelukt	
RNAi infectie-experiment	Geen significant effect				
Zoeken naar interactiepartners	Geen interactiepartners gevonden				
Expressie in verschillende stadia	in J4, niet in adult	niet in J4 of adult	vermoedelijk in hele levenscyclus	vermoedelijk in hele levenscyclus	niet in J4 of adult
Onderdrukking van de plantenafweer	Geen suppressie	Geen suppressie	Geen suppressie	Geen suppressie	
Expressie in rijst			5 transgene planten	1 transgene plant	

Hoofdstuk 6

Besluit

De bedoeling van dit onderzoek was aanwijzingen te verzamelen voor of tegen effectoridentiteit van bepaalde genen in het genoom van *Meloidogyne graminicola*. Hiertoe werden verschillende technieken toegepast.

Via in-situ hybridisatie werd één gen geïdentificeerd dat tot expressie komt in de faryngeale klieren. Dit eiwit wordt vermoedelijk gesecreteerd via het stylet en codeert dus waarschijnlijk voor een effector. *Silencing* m.b.v. siRNA's was niet succesvol. In plaats van neerregulatie werd opregulatie of onveranderde expressie van de genen in kwestie bekomen. Dit experiment gaf ook aan dat het protocol voor RNA-extractie uit nematoden geoptimaliseerd dient te worden. Er is nood aan een protocol dat uit kleinere hoeveelheden startmateriaal toch voldoende kwalitatief RNA oplevert. Een infectieproef met siRNA-behandelde nematoden waarin een potentiële effector werd opgeregeerd toonde een niet-significante verhoging van de infectie-efficiëntie. Dit is een zwakke aanwijzing dat het gen in kwestie inderdaad codeert voor een effector. *Yeast-2-hybrid* leverde geen interactors op voor het ene geteste gen. Expressie van verschillende genen gedurende de levenscyclus kon moeilijk in kaart gebracht worden door gebrek aan nematoden-RNA. Het protocol voor RNA-extractie uit nematoden in gallen dient geoptimaliseerd te worden. Voor een aantal genen konden uit deze proef wel voorbarige vermoedens worden afgeleid in verband met de functie van de genen. Suppressie van ETI (opgewekt door Avr3a^{KI} en R3a) kon voor geen enkel gen waargenomen worden. Transformatie van rijst was succesvol, al is het aantal getransformeerde planten voor één van beide constructen klein. Expressie werd nog niet geëvalueerd.

De resultaten van elk experiment kunnen een nieuwe indicatie inhouden voor of tegen effectoridentiteit van het onderzochte gen. Het identificeren van effectors is echter een werk van lange adem dat pas helemaal voltooid wordt wanneer ook de functie bepaald is. Uiteraard dient in de toekomst nog veel meer informatie verzameld te worden om toepassingen in nematodenbestrijding te kunnen uitwerken, zowel voor de ontwikkeling van nieuwe nematiciden als voor het produceren van resistente planten.

Bibliografie

- [1] W. Decraemer and D.J. Hunt. Structure and classification. In *Plant Nematology* (eds R.N. Perry and M. Moens), pages 3–32. CABI, 2006.
- [2] S.A. Hogenhout, R.A.L. Van der Hoorn, R. Terauchi, and S. Kamoun. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(2):115–122, 2009.
- [3] G. Huang, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, and R.S. Hussey. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39):14302–14306, 2006.
- [4] A. Haegeman, L. Bauters, T. Kyndt, M.M. Rahman, and G. Gheysen. Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Molecular Plant Pathology*, 14(4):379–390, 2013.
- [5] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Rice and water. <http://www.knowledgebank.irri.org/ewatermgt/courses/course1/modules/module01/m01101.htm> (gelezen 14 februari 2013).
- [6] IRRI International Rice Research Institute. Rice basics. http://www.irri.org/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=9081&lang=en (gelezen 14 februari 2013).
- [7] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Crop Health - Fungal diseases of rice. <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/fungal-diseases-of-rice.html> (gelezen 17 februari 2013).
- [8] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Crop Health - Insects. <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/insects-crop-health-2736.html> (gelezen 17 februari 2013).
- [9] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Rice fact sheets - Armyworms. <http://www.knowledgebank.irri.org/rkb/pest-management-fact-sheets/insects-fact-sheet.html> (gelezen 17 februari 2013).
- [10] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Rice Doctor - Bacterial leaf blight. <http://www.knowledgebank.irri.org/RiceDoctor/information-sheets-mainmenu-2730/diseases-mainmenu-2735/bacterial-leaf-blight-mainmenu-2758.html> (gelezen 3 maart 2013).

- [11] G. Karssen and M. Moens. Root-knot nematodes. In *Plant Nematology* (eds R.N. Perry and M. Moens), pages 59–88. CABI, 2006.
- [12] nematoden.be. definitie - *Meloidogyne*. <http://www.nematoden.be/nl/definitie/definitie-meloidogyne/> (gelezen 23 februari 2013), 2013.
- [13] P. De Ley and M. L. Blaxter. Systematic position and phylogeny. In *The Biology of Nematodes*, D.L. Lee, ed., London: Taylor and Francis, pp. 1-30.
- [14] T. Hewezi and T. Baum. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012.
- [15] E.L. Davis, R.S. Hussey, T.J. Baum, J. Bakker, and A. Schots. Nematode parasitism genes. *Annual review of Phytopathology*, 38:365–396, 2000.
- [16] J.D. Eisenback. Coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356037> (gelezen 14 februari 2013).
- [17] IRRI International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank - Rice Doctor - Nematodes (root knot). <http://www.knowledgebank.irri.org/RiceDoctor/information-sheets-mainmenu-2730/pests-mainmenu-2737/nematodes-root-knot-mainmenu-2809.html?task=view> (gelezen 14 februari 2013).
- [18] J. Bridge, R.A. Plowright, and D. Peng. Nematode parasites of rice. In *Plant Parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2nd edition* (eds M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge), pages 87–130. CABI, 2005.
- [19] G. Gheysen and M.G. Mitchum. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current opinion in Plant Biology*, 14(4):415–421, 2011.
- [20] The American Phytopathological Society. Root-knot nematode. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx> (gelezen 17 februari 2013), 2013.
- [21] Monsanto Company. Nematodes in cotton. <http://www.aganytime.com/Cotton/Pages/Article.aspx?name=Nematodes-in-Cotton---TX&fields=article&article=417> (gelezen 16 februari 2013), 2012.
- [22] J. Padgham. Management of the rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) . <http://mulch.mannlib.cornell.edu/rootknot/index.html> (gelezen 17 september 2012).
- [23] CABI. Plantwise - rice root knot nematode (*Meloidogyne graminicola*). <http://www.plantwise.org/?dsid=33243&page=4270&site=234> (gelezen 14 februari 2013).
- [24] S.J. Turner and J.A. Rowe. Cyst nematodes. In *Plant Nematology* (eds R.N. Perry and M. Moens), pages 91–122. CABI, 2006.
- [25] M.G.K. Jones and H.L. Payne. Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of Nematology*, 10(1):70–84, 1978.

- [26] W. Grunewald, G. van Noorden, G. van Isterdael, T. Beeckman, G. Gheysen, and U. Mathesius. Manipulation of Auxin Transport in Plant Roots during *Rhizobium* Symbiosis and Nematode Parasitism. *Plant Cell*, 21(9):2553–2562, 2009.
- [27] L.W. Duncan and M. Moens. Migratory endoparasitic nematodes. In *Plant Nematology* (eds R.N. Perry and M. Moens), pages 123–152. CABI, 2006.
- [28] K. Lambert and S. Bekal. Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroNematodes.aspx> (gelezen 24 februari 2013), 2002.
- [29] A. Haegeman, S. Mantelin, J.T. Jones, and G. Gheysen. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene*, 492(1):19–31, 2012.
- [30] J.D.G. Jones and J.L. Dangl. The plant immune system. *Nature*, 444(7117):323–329, 2006.
- [31] J.P. Semblat, M.N. Rosso, R.S. Hussey, P. Abad, and P. Castagnone-Sereno. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(1):72–79, 2001.
- [32] C.A. Gleason, Q.L. Liu, and V.M. Williamson. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene Mi-1 leads to acquisition of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5):576–585, 2008.
- [33] Y. Spiegel and M.A. McClure. The surface-coat of plant-parasitic nematodes - chemical-composition, origin and biological role - a review. *Journal of Nematology*, 27(2):127–134, 1995.
- [34] A. Goverse, J. Biesheuvel, G.J. Wijers, F.J. Gommers, J. Bakker, A. Schots, and J. Helder. In planta monitoring of the activity of two constitutive promoters, CaMV 35S and TR2', in developing feeding cells induced by *Globodera rostochiensis* using green fluorescent protein in combination with confocal laser scanning microscopy. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52(4):275–284, 1998.
- [35] P.E. Urwin, S.G. Moller, C.J. Lilley, M.J. McPherson, and H.J. Atkinson. Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(3):394–400, 1997.
- [36] E.L. Davis, R.S. Hussey, and T.J. Baum. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, 20(3):134–141, 2004.
- [37] A.A. Elling, E.L. Davis, R.S. Hussey, and T.J. Baum. Active uptake of cyst nematode parasitism proteins into the plant cell nucleus. *International journal for Parasitology*, 37(11):1269–1279, 2007.
- [38] E.L. Davis, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, and T.J. Baum. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current opinion in Plant Biology*, 11(4):360–366, 2008.
- [39] D.J. Cosgrove. Growth of the plant cell wall. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 6(11):850–861, 2005.

- [40] P. Abad, J. Gouzy, J.-M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E.G.J. Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V. Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M.-C. Caillaud, P.M. Coutinho, C. Dasilva, F. De Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J.V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T.R. Maier, G.V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain, M. Robinson-Rechavi, E. Sallet, B. Segurens, D. Steinbach, T. Tytgat, E. Ugarte, C. van Ghelder, P. Veronico, T.J. Baum, M. Blaxter, T. Bleve-Zacheo, E.L. Davis, J.J. Ewbank, B. Favery, E. Grenier, B. Henrissat, J.T. Jones, V. Laudet, A.G. Maule, H. Quesneville, M.-N. Rosso, T. Schiex, G. Smant, J. Weissenbach, and P. Wincker. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8):909–915, 2008.
- [41] G. Smant, J.P.W.G. Stokkermans, Y.T. Yan, J.M. de Boer, T.J. Baum, X.H. Wang, R.S. Hussey, F.J. Gommers, B. Henrissat, E.L. Davis, J. Helder, A. Schots, and J. Bakker. Endogenous cellulases in animals: Isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9):4906–4911, 1998.
- [42] T. Hewezi, P. Howe, T.R. Maier, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, E.L. Davis, and T.J. Baum. Cellulose Binding Protein from the Parasitic Nematode *Heterodera schachtii* Interacts with *Arabidopsis* Pectin Methylesterase: Cooperative Cell Wall Modification during Parasitism. *Plant Cell*, 20(11):3080–3093, 2008.
- [43] L. Qin, U. Kudla, E.H.A. Roze, A. Goverse, H. Popeijus, J. Nieuwland, H. Overmars, J.T. Jones, A. Schots, G. Smant, J. Bakker, and J. Helder. Plant degradation: A nematode expansin acting on plants. *Nature*, 427(6969):30, 2004.
- [44] D.J. Cosgrove. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802):321–326, 2000.
- [45] R.M.D.G. Carneiro, M.R.A. Almeida, and P. Queneherve. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2(Part 6):645–654, 2000.
- [46] W.J. Postma, E.J. Sloopweg, S. Rehman, A. Finkers-Tomczak, T.O.G. Tytgat, K. van Gelderen, J.L. Lozano-Torres, J. Roosien, R. Pomp, C. van Schaik, J. Bakker, A. Goverse, and G. Smant. The Effector SPRYSEC-19 of *Globodera rostochiensis* Suppresses CC-NB-LRR-Mediated Disease Resistance in Plants. *Plant Physiology*, 160(2):944–954, 2012.
- [47] M. Jaouannet, M. Magliano, M.J. Arguel, M. Gourgues, E. Evangelisti, P. Abad, and M.N. Rosso. The Root-Knot Nematode Calreticulin Mi-CRT Is a Key Effector in Plant Defense Suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1):97–105, 2013.
- [48] E. Benkova, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertova, G. Jurgens, and J. Friml. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5):591–602, 2003.
- [49] P. Hutangura, U. Mathesius, M.G.K. Jones, and B.G. Rolfe. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian journal of Plant Physiology*, 26(3):221–231, 1999.

- [50] E.A. Doyle and K.N. Lambert. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(2):123–131, 2003.
- [51] C. Lee, D. Chronis, C. Kenning, B. Peret, T. Hewezi, E.L. Davis, T.J. Baum, R. Hussey, M. Bennett, and M.G. Mitchum. The Novel Cyst Nematode Effector Protein 19C07 Interacts with the *Arabidopsis* Auxin Influx Transporter LAX3 to Control Feeding Site Development. *Plant Physiology*, 155(2):866–880, 2011.
- [52] G.Z. Huang, R.H. Dong, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, and R.S. Hussey. A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(5):463–470, 2006.
- [53] L.D. Pysh, J.W. Wysocka-Diller, C. Camilleri, D. Bouchez, and P.N. Benfey. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal*, 18(1):111–119, 1999.
- [54] D.P. Lohar and D.M. Bird. *Lotus japonicus*: A new model to study root-parasitic nematodes. *Plant and Cell Physiology*, 44(11):1176–1184, 2003.
- [55] M. Barcala, A. Garcia, J. Cabrera, S. Casson, K. Lindsey, B. Favery, G. Garcia-Casado, R. Solano, C. Fenoll, and C. Escobar. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant Journal*, 61(4):698–712, 2010.
- [56] J. De Meutter, T. Tytgat, E. Witters, G. Gheysen, H. Van Onckelen, and G. Gheysen. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology*, 4(4):271–277, 2003.
- [57] J. De Meutter, T. Tytgat, E. Prinsen, G. Gheysen, H. Van Onckelen, and G. Gheysen. Production of auxin and related compounds by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 70(1):51–60, 2005.
- [58] J. Parkinson and M. Blaxter. Expressed sequence tags: An overview. In J. Parkinson, editor, *Expressed Sequence Tags (ESTs)*, volume 533 of *Methods in Molecular Biology*, pages 1–12. Humana Press, 2009.
- [59] R.S. Hussey, G. Huang, and R. Allen. Microaspiration of esophageal gland cells and cDNA library construction for identifying parasitism genes of plant-parasitic nematodes. In J.M. McDowell, editor, *Plant Immunity*, volume 712 of *Methods in Molecular Biology*, pages 89–107. Humana Press, 2011.
- [60] B.L. Gao, R. Allen, T. Maier, E.L. Davis, T.J. Baum, and R.S. Hussey. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(8):720–726, 2003.
- [61] G.Z. Huang, B.L. Gao, T. Maier, R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, and R.S. Hussey. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(5):376–381, 2003.

- [62] C.H. Opperman, D.M. Bird, V.M. Williamson, D.S. Rokhsar, M. Burke, J. Cohn, J. Cromer, S. Diener, J. Gajan, S. Graham, T.D. Houfek, Q. Liu, T. Mitros, J. Schaff, R. Schaffer, E. Scholl, B.R. Sosinski, V.P. Thomas, and E. Windham. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39):14802–14807, 2008.
- [63] S. Bellaïfiore, Z. Shen, M.-N. Rosso, P. Abad, P. Shih, and S.P. Briggs. Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential. *PLoS Pathogens*, 4(10), 2008.
- [64] S. Jaubert, T.N. Ledger, J.B. Laffaire, C. Piotte, P. Abad, and M.N. Rosso. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2):205–211, 2002.
- [65] M. Bakhtia, P.E. Urwin, and H.J. Atkinson. Characterisation by RNAi of pioneer genes expressed in the dorsal pharyngeal gland cell of *Heterodera glycines* and the effects of combinatorial RNAi. *International journal for Parasitology*, 38(13):1589–1597, 2008.
- [66] T. Hewezi, P.J. Howe, T.R. Maier, R.S. Hussey, M.G. Mitchum, E.L. Davis, and T.J. Baum. *Arabidopsis* Spermidine Synthase Is Targeted by an Effector Protein of the Cyst Nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiology*, 152(2):968–984, 2010.
- [67] B.C. Yadav, K. Veluthambi, and K Subramaniam. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 148(2):219–222, 2006.
- [68] R.S. Hussey, E.L. Davis, and T.J. Baum. Cyst nematode resistant transgenic plants. <http://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2007087153&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio> (gelezen 4 maart 2013), 2007.
- [69] Promega Corporation. *Technical manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*, 2010.
- [70] Swiss Institute of Bioinformatics. ExPASy translate tool. <http://web.expasy.org/translate/> (gelezen 24 april 2013).
- [71] National Center for Biotechnology Information. Standard protein blast. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn (gelezen 23 april 2013).
- [72] National Center for Biotechnology Information. . (gelezen 23 april 2013).
- [73] Inra Paca Plant-Nematode interaction team. *Meloidogyne incognita* resources - Blast. <http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/blast/blast.html> (gelezen 23 april 2013).
- [74] W.A. Kibbe and R.H. Lurie. Oligonucleotide Properties Calculator. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (gelezen 22 maart 2013).

- [75] National Center for Biotechnology Information. Standard nucleotide blast. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome (gelezen 22 maart 2013).
- [76] Institute for theoretical chemistry. RNA fold Webserver. <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi> (gelezen 22 maart 2013).
- [77] Life Technologies Corporation. Silencer[®] siRNA Construction Kit - Large Scale Synthesis and Purification of siRNAs, 2010.
- [78] Invitrogen. The Gateway[®] Cloning System - How to generate an entry clone. https://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CD8QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.invitrogen.com%2Fetc%2Fmedialib%2Fen%2Ffilelibrary%2Fppt.Par.79113.File.dat%2F&ei=SsFyUaDjI8fWPY24gIAD&usg=AFQjCNF9nIAFUp09PhAttb.E21_KUJDpzA&bvm=bv.45512109,d.ZWU (gelezen 20 april 2013).
- [79] Invitrogen. pDONR[™]221 / pDONR[™]/Zeo . http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdonr221_pdonrzedo_map.pdf (gelezen 5 april 2013).
- [80] Invitrogen. pDEST[™]32. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdest32_map.pdf (gelezen 5 april 2013).
- [81] Invitrogen. pDEST[™]22. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdest22_map.pdf (gelezen 24 april 2013).
- [82] K. Mansour, D. Inzé, and A. Depicker. GATEWAY[™] vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5):193–195, 2002.
- [83] J.H. McDonald. *Handbook of Biological Statistics*, pages 70–75. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, 2 edition, 2009.
- [84] Plant Systems Biology VIB UGent. pMBb7Fm21GW-UBIL. <http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pMBb7Fm21GW-UBIL/search/index/overexpression/any> (gelezen 21 maart 2013).
- [85] M. Jaouannet, L. Perfus-Barbeoch, E. Deleury, M. Magliano, G. Engler, P. Vieira, E.G.J. Danchin, M.D. Rocha, P. Coquillard, P. Abad, and M.-N. Rosso. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist*, 194(4):924–931, 2012.
- [86] E. Roze, B. Hanse, M. Mitreva, B. Vanholme, J. Bakker, and G. Smant. Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology*, 9(1):1–10, 2008.
- [87] S. Rehman, W. Postma, T. Tytgat, P. Prins, L. Qin, H. Overmars, J. Vossen, L.-N. Spiridon, A.-J. Petrescu, A. Goverse, J. Bakker, and G. Smant. A Secreted SPRY Domain-Containing Protein (SPRYSEC) from the Plant-Parasitic Nematode *Globodera rostochiensis* Interacts with a CC-NB-LRR Protein from a Susceptible Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3):330–340, 2009.

- [88] J. Padgham. Using siRNA for gene silencing is a rapidly evolving tool in molecular biology. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/rnai-sirna/general-articles/-sirna-design-guidelines.html> (gelezen 16 mei 2013).
- [89] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, A. Khvorova, and W.S. Marshall. Rational sirna design for rna interference. *Nature Biotechnology*, 22(3):326 – 330, 2004.
- [90] J.J. Dalzell, P. McVeigh, N.D. Warnock, M. Mitreva, D.McK Bird, P. Abad, C.C. Fleming, T.A. Day, A. Mousley, N.J. Marks, and A.G. Maule. RNAi Effector Diversity in Nematodes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), 2011.
- [91] C. Britton, B. Samarasinghe, and D.P. Knox. Ups and downs of RNA interference in parasitic nematodes. *Experimental Parasitology*, 132(1, SI):56–61, 2012.
- [92] P.E. Urwin, C.J. Lilley, and H.J. Atkinson. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(8):747–752, 2002.
- [93] B. Xue, N. Hamamouch, C. Li, G. Huang, R.S. Hussey, T.J. Baum, and E.L. Davis. The 8D05 Parasitism Gene of *Meloidogyne incognita* Is Required for Successful Infection of Host Roots. *Phytopathology*, 103(2):175–181, 2013.
- [94] M.N. Rosso, M.P. Dubrana, N. Cimbolini, S. Jaubert, and P. Abad. Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7):615–620, 2005.
- [95] J. Shingles, C.J. Lilley, H.J. Atkinson, and P.E. Urwin. *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Experimental Parasitology*, 115(2):114–120, 2007.
- [96] J.J. Dalzell, S. McMaster, M.J. Johnston, R. Kerr, C.C. Fleming, and A.G. Maule. Non-nematode-derived double-stranded RNAs induce profound phenotypic changes in *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* infective juveniles. *International journal for Parasitology*, 39(13):1503–1516, 2009.
- [97] J.J. Dalzell, S. McMaster, C.C. Fleming, and A.G. Maule. Short interfering RNA-mediated gene silencing in *Globodera pallida* and *Meloidogyne incognita* infective stage juveniles. *International journal for Parasitology*, 40(1):91–100, 2010.
- [98] M.-J. Arguel, M. Jaouannet, M. Magliano, P. Abad, and M.-N. Rosso. sirnas trigger efficient silencing of a parasitism gene in plant parasitic root-knot nematodes. *Genes*, 3(3):391–408, 2012.
- [99] Z. Issa, W.N. Grant, S. Stasiuk, and C.B. Shoemaker. Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. *International journal for Parasitology*, 35(9):935–940, 2005.

- [100] M. Lendner, M. Doligalska, R. Lucius, and S. Hartmann. Attempts to establish RNA interference in the parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 161(1):21–31, 2008.
- [101] N. Patel, N. Hamamouch, C. Li, T. Hewezi, R.S. Hussey, T.J. Baum, M.G. Mitchum, and E.L. Davis. A nematode effector protein similar to annexins in host plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(1):235–248, 2010.
- [102] W. Van Criekinge and R. Beyaert. Yeast two-hybrid: State of the art. *Biological Procedures Online*, 2(1):1–38, 1999.
- [103] Sigma-Aldrich Co. Pulldown. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/proteomics-products.html?TablePage=108655505> (gelezen 31 mei 2013).
- [104] N. Ithal, J. Recknor, D. Nettleton, L. Hearne, T. Maier, T.J. Baum, and M.G. Mitchum. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(3):293–305, 2007.
- [105] F. De Luca, M. Di Vito, E. Fanelli, A. Reyes, N. Greco, and C. De Giorgi. Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* and its expression as related to different developmental stages and temperature. *Gene*, 440(1-2):16–22, 2009.
- [106] P. Thorpe, V. Blok, L. Pylypenko, P. Urwin, and J.T. Jones. Functional Analysis of a Potato Cyst Nematode (*Globodera pallida*) Effector Protein. http://www.hutton.ac.uk/webfm_send/426 (gelezen 19 mei 2013).
- [107] C.M. Agu. Soybean susceptibility to *Meloidogyne javanica* and *Rhizoctonia solani* in selected ultisols of south eastern Nigeria. *Journal of Sustainable Agriculture*, 20(3):101–110, 2002.
- [108] Center for biological sequence analysis Technical University of Denmark DTU. SignalP 4.1 Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (gelezen 31 maart 2013).
- [109] Invitrogen. pDESTTM22. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdest22_mcs.pdf (gelezen 24 april 2013).
- [110] Invitrogen. pDESTTM32. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdest32_mcs.pdf (gelezen 24 april 2013).

Bijlage A

Media en oplossingen

A.1 Rijsttransformatie

Tabel A.1.1: Callus inducerend medium (CIM)

Component	Hoeveelheid
Chu N6 zouten met vitaminen	3,95 g/l
Sucrose	30 g/l
Caseïne hydrolysaat	1 g/l
Proline	1,5 g/l
2,4-D	2 mg/l
Agarose	8 g/l

Tabel A.1.2: YEB-medium

Component	Hoeveelheid
Runderextract	5 g/l
Bacto-gistextract	1 g/l
Bacto Pepton	5 g/l
Sucrose	5 g/l
1M $MgSO_4$	2 ml
pH	7,3

Tabel A.1.3: LB-medium

Component	Hoeveelheid
LB-poeder (Duchefa)	25 g/l
pH	7,2

Tabel A.1.4: Tris-acetaat-EDTA (TAE)-buffer

Component	Hoeveelheid
tris-acetaat	400 μM
EDTA	10 μM

Tabel A.1.5: AA Aminozuren (20x stock)

Component	Hoeveelheid
L-glutamine	17,52 g/l
L-aspartaatzuur	5,32 g/l
L-arginine	3,48 g/l
Glycine	1,5 g/l
2,4-D	0,15 g/l

Tabel A.1.6: R2COMAS-medium

Component	Hoeveelheid
Devgen R2 zouten	2,43 g/l
B5-vitaminen	1 ml/l
Sucrose	20 g/l
Glucose	10 g/l
Caseïne hydrolysaat	1 g/l
2,4-D	2 mg/l
Micro-agar	7 g/l
Acetosyringone (zie tabel A.1.7)	1 ml/l

Tabel A.1.7: Acetosyringone

Component	Hoeveelheid
70% Ethanol	10 ml
Acetosyringone	0,195 g

Tabel A.1.8: AA-1

Component	Hoeveelheid
Devgen modified Gamborg zouten	4,19 g/l
Sucrose	68,5 g/l
Glucose	36 g/l
Caseïne hydrolysaat	0,5 g/l
AA Aminozuren (20x stock) (zie tabel A.1.5)	50 ml/l

Tabel A.1.9: N6-selectiemedium

Component	Hoeveelheid
Chu N6 zouten met vitaminen	3,95 g/l
Sucrose	30 g/l
Caseïne hydrolysaat	1 g/l
Proline	1,5 g/l
2,4-D	2 mg/l
SPI-agarose	7-8 g/l
Basta	300 mg/l

Tabel A.1.10: N6-preregeratiemedium

Component	Hoeveelheid
Chu N6 zouten met vitaminen	3,95 g/l
Sucrose	30 g/l
Caseïne hydrolysaat	1 g/l
Proline	1,5 g/l
2,4-D	1 mg/l
SPI-agarose	8 g/l
Timentin	300 mg/l

Tabel A.1.11: N6-regeneratiemedium

Component	Hoeveelheid
AA aminozuren (zie tabel A.1.5)	50 ml/l
Devgen Chu N6 medium	2 g/l
Sucrose	1 g/l
Caseïne hydrolysaat	1 g/l
$CuSO_4$	40 μM
Agarose	8 g/l
Zeatine	1 mg/l

Tabel A.1.12: Rijst-wortelinducerend medium

Component	Hoeveelheid
1/2 MS-zouten	2,15 g/l
1/2 B5-vitaminen (1000x stock)	0,5 ml/l
Sucrose	10 g/l
MES	0,5 g/l
Micro-agar	8 g/l

A.2 Kloneren van nematodegenen in de pGEM-T vector

Tabel A.2.1: SOC-medium

Component	Hoeveelheid
Trypton	20 g/l
Gist extract	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
250 mM KCl	10 ml/l
20 % filter-gesteriliseerde glucose oplossing	18 ml/l
2M $MgCl_2$ (steriel)	5ml/l
pH	7,0

A.3 Lokalisatie van expressie

Tabel A.3.1: M9-buffer

Component	Hoeveelheid
Na_2HPO_4	6 g/l
KH_2PO_4	3 g/l
NaCl	5 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g/l
pH	7,0

Tabel A.3.2: Paraformaldehyde in M9-buffer

Component	Hoeveelheid
paraformaldehyde	0,5 g / 25 ml M9-buffer

Het oplossen dient te gebeuren in een warmwaterbad (zonder te koken). Deze oplossing kan opgeslagen worden bij $-20^\circ C$.

Tabel A.3.3: DEPC-water

Component	Hoeveelheid
diëthylpyrocarbonaat	1 ml
gedestilleerd water	999 ml

Goed schudden en overnacht laten staan bij kamertemperatuur alvorens te autoclavieren.

Tabel A.3.4: Hybridisatiebuffer

Component	Hoeveelheid
gedeïoniseerd formamide	20 ml
20x SSC	8 ml
10% blocking reagens	4 ml
20% SDS	4 ml
100x Denhardt's oplossing	0,4 ml
0,1M EDTA (pH 8,0)	0,4 ml
fish sperm DNA (10 mg/ml)	0,8 ml
gist tRNA	0,25 ml
DEPC-water (zie tabel A.3.3)	2,15 ml

Bewaren bij $-20^\circ C$.

Tabel A.3.5: 4xSSC

Component	Hoeveelheid
NaCl	600 mM
Na_3 -citraat	60 mM
pH	7,0

Tabel A.3.6: Maleic acid buffer

Component	Hoeveelheid
maleic acid	0,1M
NaCl	0,15M
pH	7,5

Tabel A.3.7: Detectiebuffer

Component	Hoeveelheid
TrisHCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
$MgCl_2$	50 mM
pH	9,5

Tabel A.3.8: Kleuroplossing

Component	Hoeveelheid
NBT-stock (100 mg/ml)	3,4 μl
X-fosfatase stock (50 mg/ml)	3,5 μl
alkaline fosfatase detectiebuffer	1 ml

A.4 Hoagland-oplossing

Tabel A.4.1: H5 stock oplossing

Component	Hoeveelheid
H_3BO_3	0,85 g/l
$MnSO_4, 7H_2O$	0,84 g/l
$ZnSO_4, 7H_2O$	44 mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}, 4H_2O$	18,4 mg/l
$CuSO_4, 5H_2O$	39,4 mg/l

Tabel A.4.2: Hoagland

Component	Hoeveelheid
2,5 M KNO_3	2 ml
0,5 M KH_2PO_4	2 ml
2,5 M $Ca(NO_3)_2$	2 ml
1 M $MgSO_4$	2 ml
H5 stock oplossing (zie tabel A.4.1)	2 ml
(6,59 g/l $FeSO_4, 7H_2O$ en 9,31 g/l EDTA b. sodium salts, $2H_2O$)	3ml
gedestilleerd water	987 ml

A.5 Yeast-2-hybrid

DMSO: store in aliquots at -20°C

1M Tris pH 7.5

- 6.057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (T14)
- 50 ml of water
- Adjust pH to 7.5 with HCl

0.5 M EDTA

- 18.6 g EDTA (E1 = E10x)
- 100 ml of water
- Adjust pH to 8.0 with NaOH
- Let dissolve by stirring and heating to 50°C

10x TE buffer

- 1 ml 1M Tris-HCl (pH7.5)
- 200 µl 0.5M EDTA (pH 8.0)
- 98.8 ml of water

40% glucose (filter sterilized)

- 200 g glucose(G6) in 500 ml of water
- heat while stirring to dissolve well
- Filter sterilize and aliquot in falcons of 50 ml
- Store at RT

0.2% adenine sulfate (filter sterilized)

- 0.2 g adenine sulfate (A60x) in 100 ml of water
- Filter sterilize
- Store at 4°C

LB plates with gentamycin (25 µg/ml)

- 12.5 g of LB Broth
- 7.5 g of agar
- 500 ml of water
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 125 µl of 100 mg/ml gentamycin stock

LB plates with ampicillin or carbenicillin (100 µg/ml)

- 12.5 g of LB Broth
- 7.5 g of agar
- 500 ml of water
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 500 µl of 100 mg/ml carbenicillin stock

Herring sperm DNA

- prepare a solution of 5 µg/µl
- Pass the solution through a fine syringe several times (to shear the DNA)
- Boil for 10 min at 100°C
- Check 1 µl on gel
- Filter sterilize

Z- buffer

- 5.35 g Na₂HPO₄·2H₂O (S62)
- 2.75 g NaH₂PO₄·H₂O (S20)
- 0.375 g KCl (P25)
- 0.123 g MgSO₄·7H₂O (M3)
- Add water up to 500 ml
- Adjust pH to 7.0 with NaOH
- Autoclave

YPAD liquid medium (300 ml)

- 3 g yeast extract (Y03)
- 6 g Bacterial peptone (P64)
- 280.5 ml water
- Adjust pH to 6.0 with HCl
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 4.5 ml 0.2% adenine sulfate (filter sterilized)
- Add 15 ml 40% glucose (filter sterilized) (!! you can also add this just before use to avoid contamination)

YPAD medium with agar (600 ml)

- 6 g yeast extract (Y03)
- 12 g Bacterial peptone (P64)
- 561 ml water
- Adjust pH 6.0 with HCl
- Add 12 g of agar
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 30 ml 40% glucose (filter sterilized)
- Add 9 ml 0.2% adenine sulfate (filter sterilized)
- Pour small plates

TL medium with agar (1L)

- 6.7 g yeast nitrogen base w/o AA (Y04)
- 1.54 g TL dropout supplement (Y05)
- Add 950 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Add 20 g of agar
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 50 ml of filter sterilized 40% glucose
- Pour small and big plates, remove air bubbles with a sterile tip
- Let the plates solidify with the lid on and let dry for an extra hour with the lid off

TL liquid medium (500 ml)

- 3.35 g yeast nitrogen base w/o AA (Y04)
- 0.77 g TL dropout supplement (Y05)
- Add 475 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 25 ml of filter sterilized 40% glucose

-leu dropout medium with agar (1L)

- 6.7 g yeast nitrogen base w/o AA (Y04)
- 0.69 g -leu supplement (Y07)
- Add 950 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Add 20 g of agar
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 50 ml of filter sterilized 40% glucose
- Pour small and big plates, remove air bubbles with a sterile tip
- Let the plates solidify with the lid on and let dry for an extra hour with the lid off

-leu liquid dropout medium (500 ml)

- 3.35 g yeast nitrogen base w/o AA (Y04)
- 0.345 g -leu supplement (Y07)
- Add 475 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 25 ml of filter sterilized 40% glucose (!! you can also add this just before use to avoid contamination)

TLH10-medium with agar (500 ml)

- 3.35 g yeast nitrogen base w/o AA
- 0.31 g TLH supplement (Y06)
- Add 475 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Add 10 g of agar
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 25 ml of filter sterilized 40% glucose
- Add 0.415 g of 3-aminotriazole (!! toxic !!)
- Pour big plates, remove air bubbles with a sterile tip
- Let the plates solidify with the lid on and let dry for an extra hour with the lid off

TLU medium with agar (500 ml)

- 3.35 g yeast nitrogen base w/o AA
- 0.31 g TLU supplement
- Add 475 ml of water
- Adjust pH to 5.6 with NaOH
- Add 10 g of agar
- Autoclave and let cool down to 55°C
- Add 25 ml of filter sterilized 40% glucose
- Pour big plates, remove air bubbles with a sterile tip
- Let the plates solidify with the lid on and let dry for an extra hour with the lid off

10x LiAc

- 5.101 g lithium acetate dehydrate (L5 Glyco)
- 50 ml of water
- filter sterilize

1x LiAc/1xTE

- 5 ml 10x LiAc
- 5 ml 10x TE
- 40 ml of water
- filter sterilize

1x LiAc/0.5xTE

- 5 ml 10x LiAc
- 2.5 ml 10x TE
- 42.5 ml of water
- filter sterilize

1x LiAc/40%PEG3350/1xTE

- 20 g PEG3350 (P19) in 50 ml falcon
- 15 ml of water
- shake for 1h30min at 200 rpm at 30°C
- Add 5 ml of 10x LiAc
- Add 25 ml of 10x TE
- Add water up to 50 ml, shake until everything is mixed well
- filter sterilize

A.6 Transiënte expressie in tabak

Tabel A.6.1: Infiltratiebuffer

Component	Hoeveelheid
1M $MgCl_2$	1ml/100ml
0,5M MES	2ml/100ml
0,1M acetosyringone	200 μ l/100ml

Bijlage B

Sequenties UK8, UK18, UK50, UK52 en UK67: genen, siRNA's, primers

De onderlijnde sequenties coderen voor een signaalpeptide, zoals voorspeld aan de hand van de SignalP 4.1 webserver [108]. Start- en stopcodons zijn steeds onderlijnd en vet weergegeven.

UK 8

GGGGGAAACACAACAACAACTCATTAACTTTACAACTTAAAAATATTAAATTAAATTATTTAAATTTATT
TAAA**ATGA**ATTTTTCTATTTATACTGTTTTCTATTCTTTCTGGCTATTTTAGGTCTTTTTCTTCTG**AAAAGTAAA**
GCTCAACAACCACCACCTAAACCAGCAACAGTTACTGCTGTAAACCAGGAGTACCATCACCACAACAAAAGA
CTGGGGGAAATA**AAGACTCTTCTGAGTCAGATG**AAGACGACAAAATTTCCCATCAAAAAACAAATTCTACAAC
TGGGGCTGCTCCTCCACCTATCCCAGCATTGTTGCCAACAAAATGCTGCTGATCCGGCCGTTCAAAAATGTTGTA
CAGCACTAAAAACAGCAGCTGCTGCGCATAAAGTGGT**ACAAGGCGCTGTAAATTGC**CAGAATGTGTTCAAGT
TGGGCAAAAATGTAATAATGCACCTACAGTAAATGGTGT**GCACATACTCAGGTTGCA**GCAAATGCTCCAAAA
CCACAT**TAA**

Eiwit: MNFSIYTVFLFFLAILGLFSSESKAQQPPPKPATVTAVKPGVPSPOQKTGGNKDSSESEDDDKI
SHQKTNSTTGAAPPPIPAFCQQNAADPAVQKCTALKTAAAAHKVVQGAVKLPECVQCGQKCNNAPTVNGAAHTQ
VAANAPKPH*

UK8-F : GGGggAAacaCAACAACAAA

UK8-R : TTAATGTGGTTTTGGAGCATTGTC (526 bp)

UK8_siRNA-A_S : AAAGTAAAGCTCAACAACCACCTGTCTC

UK8_siRNA-A_AS : AAGTGGTTGTTGAGCTTACTTTCTGTCTC

UK8_siRNA-B_S : AAGACTCTTCTGAGTCAGATGCTGTCTC

UK8_siRNA-B_AS : AACATCTGACTCAGAAGAGTCTTCTGTCTC

UK8-qPCR-F : ACAAGGCGCTGTAAATTGC

UK8-qPCR-R : GCTGCAACCTGAGTATGTGC (96 bp)

UK8-attb1: aaaaagcaggcttaCAACAACCACCACCTAAACC

UK8-attb1+start : aaaaagcaggctta**ATG**CAACAACCACCACCTAAACC

UK8-attb2+stop : agaaagctgggtg**TTAATGTGGTTTTGGAGCATTGTC**

UK 28

GACATTAGAAACATTTCCAGTAGAAA**ATG**CCTTAGTCGCAATTTATTCCTTTTAGCGACTTTTTGTCT
TGCATTCTATCAAGCTTTTGGAGAGTTTTCTGATTTCTTCAGTGAAGCGAATTTGAAGAAATTAACA
CAAATTTTGATTTAGCTAAAAATAGTGAAGTGAAACAGAACTGATG**AAGCAAGTCAAGTTGATCAA**
AAAAGTAAAGATGGTTCTGAACCTCACGGGAAACAACGAAAAGAAAAAAGGAAAGAAATTTGAAGA
AGAGCAATTAAGTTTTAAGGACGAGAGACAGCGTGG**ACGTGAAGGTTTTGGTTTCCATAGAG**AGGATG
AGGACGGTGATGAACAAGGTCTACCTACAGACTTGATGATCCCGAGTACCGTACACGTCCAC**CGACT**
GAAGAACCAGGCTCTGACGAGCCTTCTAGTAGTGCTCCTAATGGTGATTTTGTACTTCCAAAGAAGCC
TGTACAACCTG**AACATCCATCTTCCCAACAGC**CACAACTTCCACCTCACTCCCCTCCACATCCATCAA
AACCAAACAGTCCTTCCCCTTCCAGTCATCAATTACCAAAAAATCCCCCAAAGAATTCTGGGAATTCA
AGCTTGCCTCCTCCACACGGAAAGGAATGTAACTAAAATGGTACCAAAAAATGGCCCAAAAGCTT**CA**
TATTAAAAAAATTTGACTGC**TAA**ATTTGAGAAAATGAAGATTTTAAGCAATTAAGAATAAATAAAT
TTGGGTATTTAAATTAATAAATAAATAATGGGATTAAGCTTTATTTAATTACTAATTTAATTCATTTA
TTAATAAAAAATAAAGAAGTAAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Eiwit: MLSRNLFLLATFCLAFYQAFGEFSDFFSGSEFEEINTNFDLAKNSGSETETDEASQVDQK
SKDGSELHGKQRKEKKGKKEEQLSFKDERQREGFGFHREDEDGDEQGPTYRLDDPE
YRTRPTEEPGSDEPSSAPNGDFVLPKPKVQPEHPSSQQPQLPPHSPPHPSKPNSPSPS
SHQLPKNPPKNSGNSLPPPHGKECKLKWYQKLAQKLHIKKFDC*

UK28-F: **TGCTTAGTCGCAATTTATTCCTT**

UK28-R: **CCCGTGAAGTTCAGAACCAT** (206 bp)

UK28_siRNA-A_S: **AAGCAAGTCAAGTTGATCAAA**CCTGTCTC

UK28_siRNA-A_AS: AA**TTTGATCAACTTGACTTGCTT**CCTGTCTC

UK28_siRNA-B_S: **AACATCCATCTTCCCAACAGC**CCTGTCTC

UK28_siRNA-B_AS: AA**GCTGTTGGGAAGATGGATGTT**CCTGTCTC

UK28_siRNA-C_S: **AAGTTTTGGTTTCCATAGAG**CCTGTCTC

UK28_siRNA-C_AS: AA**CTCTATGGAAACCAAACCTT**CCTGTCTC

UK28-qPCR-F: **ACGTGAAGGTTTTGGTTTCC**

UK28-qPCR-R: **AGAGCCTGGTTCTTCAGTCG** (115 bp)

UK28-attb1+start: aaaaagcaggctta**ATGGAGTTTTCTGATTTCTTCAG**

UK28-attb2+stop: aaaaagctgggtg**TTAGCAGTCAAATTTTTAATATG**

UK 50

TACGGCCGGGGGATCGCAGAAATTTATTTTTCTTTTATTAAACAATTTGAAACTTTTCTCCTTTGAAA
ATGGCTAAAATCAATTTTATAAAAATTTATTCTAATTGTACAACCTTTTGTTTTGGTCATTTACCAAG
TTCAACTTGTTGTTGCTGGTTCAGATGAAGTTGAGCCACAAACAGCTAAAAATGAAAGTGAATTTAAA
GAACGTTCTTCCTTCAAGCTATATTCTGATACCTTTAGGCCAATGAAAACGCTGTAATATCGCCTAC
AAACCCACATAAGGAAAGA**CGTGAAGGAAGAAAACCTCC**TCTCAG**TCGAT**TGGGACTCCAAGTAAAT**T**
AATTTTGAAGTTCAAGTATATAAAGAAAAGACGTGTATTTTTGAAGTAAATACAATTATGACTAACTT
TTTTT

Eiwit: MAKINFIK FILIVQLLFLVIYQVQLVVAGSDEVEPQTAKNESEFKERS SFKLYSDTFRPMK
NAVISPTNPHKERREGRKLPLSRLGLQVN*

UK50-F: **TTCAGATGAAGTTGAGCCACA**
UK50-R: **TTACTTGGAGTCCCAATCGA** (182 bp)

UK50-start-SP : **GGTTCAGATGAAGTTGAGC**
UK50-attb2+stop : agaaagctgggtg**TTA**ATTTACTTGGAGTCCCA (212 bp)

UK50_siRNA_A_AS : **AACGTTCTTCCTTCAAGCTAT**CCTGTCTC
UK50_siRNA_A_S : AAATAGCTTGAAGGAAGAACGCCTGTCTC

UK50_siRNA_B_AS : **AACGCTGTAATATCGCCTACA**CCTGTCTC
UK50_siRNA_B_S : AA**TGTAGGCGATATTACAGCG**CCTGTCTC

UK50-qPCR-F : **GAAGTTGAGCCACAAACAGC**
UK50-qPCR-R : **GGGAGTTTTCTTCCTTCACG** (149 bp)

UK50-attb1+start : aaaagcaggcttaACA**ATG**GGTTCAGATGAAGTTGAGC
UK50-attb2+stop : agaaagctgggtg**TTA**ATTTACTTGGAGTCCCA

UK 52

GGGGGATTACCTTAAACAACCTCTAAAAAATACTTTGAATTAACAAAAA**ATG**TCGAAATTCCTTAT
TGTTCTTGTAATTTTTATTTTTGTTTTATTGAGAGTTCTAATGCTGGGAGA**AAAAAGGGTGTCCCC**
AACGGAGCACCTAGAGGCGATATAGGAGATGATAAAAGACATGCACAAACGGATCACGGAAAGGATAGT
GATTCTTATGGTAATTC**TAA****TGGTGGTTCTTATGGTTCAGC**TAACTCATTGGAGCTCATGGAC**AATG**
CGATCATATACCTAGAGAAGAGCTCGATTTTCAAAGGATGATTGGACAGTAAAAGCATTAAAGAAGC
TACACGAGT

Eiwit: MSKFLIVLVIFIFVFIESSNAGRKKGVPQRAPRGDIGDDKRHAQTDHGKDSYGNNSNGG
SYGSANSFGAHGQCDHIPREELDFQRMIGQ*

UK52-F : **AAAAAGGGTGTCCCAAC**
UK52-R : **CCAATCATCCTTTGAAAATCG** (197 bp)

UK52-start-SP : **GGGAGAAAAAAGGGTGTTC**
UK52+stop : **TTA**CTGTCCAATCATCCTTTG (210 bp)

UK52_siRNA_A_AS : **AAAAAAGGGTGTCCCAACG**CCTGTCTC
UK52_siRNA_A_S : AAC**CGTTGGGAACACCCTTTT**CCTGTCTC

UK52_siRNA_B_AS : **AATGCGATCATATACCTAGAG**CCTGTCTC
UK52_siRNA_B_S : AAC**CTCTAGGTATATGATCGCA**CCTGTCTC

UK52-qPCR-F : **TGGTGGTTCTTATGGTTCAGC**
UK52-qPCR-R : **CCAATCATCCTTTGAAAATCG** (93 bp)

UK52-attb1+start : aaaagcaggcttaACA**ATG**GGGAGAAAAAAGGGTGTTC
UK52-attb2+stop : agaaagctgggt**TTA**CTGTCCAATCATCCTTTG

UK67

tagtgagcgtattACGgCCGggggTCAATTAATTTATTCAATTACACCCTATAAAAACCTAcAT**ATG**
CTTtCTCTTAAACTCCacTATGGAATAGTTATTCTATTTTATTT**AATTGTTCTAATCCAGGCGGG**TGT
gCAGaTTGTCCCAGGAAATGACgaggAAGCTCATCCTCAAGAAGATGAAAGCAATACAGTGAACCTACA
TGCCCTCGGACTGATATAAAATATTCTGTACATTGTACTATAAAAAGAACTCCCATCCAATAAAAAAAGT
GCTAAAAAAGAAGAATACCTAAAAAAGATGAATTTAGTTCAAAAAGATTTTAGAAAATAATATGGAAGA
AGTAGAAAAGGAAATTAAAAAAATTAATCATTGAATTCTAACTCTtATTCTATAAATTATAATGATT
ATATAAACTGGATTAATTTTTAAAGATCATGTAGGAAGTTACTCGgTAATTAaTCT**AAAGAAAGCAACG**
CAGGAATTAACAATAGCaGAcAATATTTATATTGAAGAAATACTTTTTGTT**CGAGAAATGTGTTCTGA**
GATTAGTTATTACTTTGAAAAAAAaTATTACAAATTTTGTGAAAATTATTGTgAaGATAATCAAATTG
tAAaTAAAGTGGATAAAATAATTTCCATTTtAGACGATAATTTTCCTTTAAATATCAGCCTTGTA
TATGAaaTTAATGCAGAGAATGAAGAAAAGGaTAAAGAATTAACCTGAAGAAGAAGAGAAGGAAATTAC
TATTTTAAATGAGCCAATACAATTTCCCTAA**ACACCcTagACCTGAAGGAA**AacTggAaCATTTATTtA
AACA**TGTAAAAGGTGgAaTTCCGC**CTATATTACATaTAA**AAGCATGGTGGTCATAACAGA**TATAAGCTT
TTGCAAAAAGTACAT**TAG**AAAGGATGTTTTTCCAAAAAGAGATATTCTAACATTTTTTTTAACATTTT
AaCGACTGTAAATTATCTTTAAATTTtGTATTTTACATGTATAaTTGTGTACGCATAAAATTTTACTa
GTcAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAaCggCCGACCTCCCTAT

Eiwit: MLSLKLHYGIVILFYLIVLIQAGVQIVPGNDEEAHPQEDESNTVNYMPRTDIKYSVHCTI
KELPSNKKSAKKEEYLKKNMLVQKILENNMEEVEKEIKKIKSLNSNSYSINYNDYINWINFKDHVGSY
SVINLKKATQELTIADNIYIEEILFVREMCSEISYFFEKKYKFCENYCEDNQIVNKVDKIISILDDN
FPLKYQPCKYEINAENEKDKELTEEEKEITIFNEPIQFPKHPRPEGKLEHLFKHVKGGIPIILHIK
HGGHNRYKLLQKVH*

UK67-Fb : **AAAGAAAGCAACGCAGGAAT**

UK67-Rb: **GCGGAAtTcCACCTTTTACA** (377 bp)

UK67_siRNA-A_S: **AAGCATGGTGGTCATAACAGA** CCTGTCTC

UK67_siRNA-A_AS: AA **TCTGTTATGACCACCATGCTT** CCTGTCTC

UK67_siRNA-B_S: **AATTGTTCTAATCCAGGCGGG** CCTGTCTC

UK67_siRNA-B_AS: AA **CCCGCTGGATTAGAACAATT** CCTGTCTC

UK67_siRNA-C_S: **AACACCcTagACCTGAAGGAA**CCTGTCTC

UK67_siRNA-C_AS: AA **TTCCCTTCAGGTctAgGGTGT** CCTGTCTC

UK67-qPCR-F: **CAACGCAGGAATTAACAATAGC**

UK67-qPCR-R: **AACAACTCAGAACACATTTCTCG** (81 bp)

Bijlage C

Sequenties UK18, UK23, UK44, UK63, UK64, UK65, UK66, UK68, UK69, UK70, UK71, UK72, UK73, UK74, UK75, UK76: genen en primers

De onderlijnde sequenties coderen voor een signaalpeptide, zoals voorspeld aan de hand van de SignalP 4.1 webserver [108]. Start- en stopcodons zijn steeds onderlijnd en vet weergegeven.

UK 18

CCGATTTATTTATTTTGTATTATTTAGTGTGATCCATATATTTTGTATCTATATTTTCATTCAAATATCATTGTTTACAAAT**ATG**GCGGAAA
GCTCTTCCAAAGATTGAGCAGCTCCAAAAAATGGGCATGCAATTATTGTACATTTCTGAATTGGGATGCTAGCATTAATATGTGTACTTTGTGTA
TCAGCCTAGAAATAAACCAATTCCTATTGGAAGAACTTTGTCTACCAATGAGTCTTTAGTTAGAACTTCTATTTTACATGATGAACAGCTTCGT
TGCCATGCCCCAATTGTACTTATTGAAATGTCAACGTACAAAACGATGATTCATTGTACTACTGATCGACCCTTCGATATGCATCTCCAC
CATTGTTAGCAATCCTGTAATTCCTGTTAAGCACTCTAATACAAAAATCAGCAGCACAAGACAATAATCTATTTCTCGTGCCTTAATAA
ATGGACTGTGCAGAGTTGTACATT**TGATAATTGGCCAAAAGCAAC**TAAATGTACTCTTTTGTGGTCAAAAACGTTTACTATCTCGAGTTC
AAAGTCTTTCTCTCTCAGGAATCTGATGTTCAAATGTTTATAGGAAGCGTAATTCAGGTGAAGCTCAGCATCAAGATGCTGAAAGAACAGA
AAGTAGAGGAGATATTGACTTGGAGCTGTTAAATCAATGACAATTGGAACCTTAGGCTTGGGAATCGGCCTGATCACAAACAAAGACCGGCAT
GGGTCAAAGCGTAGTGAGCAA**TAA**ATATTGGGGTAGTTAGTGATATATGTACTCTTCTGGGGGATGCGAATATTTTTTCGACCTCAATA
AAAATTTGCGGCCTTTCCGTGCATGTTAAATTTCTGATTTTTCTTATGCCACATTTTT**ATTATTGTTTCCACCACCG**GTTTTATTTTA
GCCCTGTCAATATTTACCAGATTGTTTAAAAATTAAGCTTTGATATGGCG

Eiwit: MAESSKSDSAAPKKWACNYCTFLNWDASIKVLCYQPRNKPLIEELCPNESLVRVTSILHDEQLRWPCPTCTYLNCQRTKRCI
HCTTDRPLRYASPPFVSNPVI PVKHSNTQHQKDNNSISRALNKWTCQSCFDNWPKATKCTLGQKRLLSRVQSLSPQESDVQNVHRKRN
GEAQHQDAERTESRGDIDLELLNQLTIGTPRLGNRPDHNKDRHSGSRSEQ*

UK18-F : **TGATAATTGGCCAAAAGCAAC**
UK18-R : **CGGTGGTGGGAAACAATAAT** (424 bp)

UK 23

GGCGTCTTCTGCTCCTCTTAGGGGATCCTCATCTCGGGCGCTGTCCCGCCCTCTCGGGCGCGGGATCCGGCAGGTGGCTGCTCGGGCGCTG
TTGCGGTGCCGATGTCCCTCGGCACTACCGTCCGGCGCGGCCTCTTTGGGCACAATACAAAATACAGCGGCAGTCAATAAATTTGAAATAAGACG
AATAGGGGAAGGACGACAGAACTGCCGAATGGGGCAGCGACTGCTAGCTCGTATGGAACAGGGATTAAGAGACTAGCAGTGAGTTCCACCG
TAAGCCAAACGGTTACGGTAATCCCGGACCTCCATGTTATACCCGAGAGCTCCCTGAAGCTCTGGATATAATCTGAGGTGTAGGAATGCCCGT
GAAGATGGTATTATCCACGATTC**GGGAGAGAACCTTCGAGACA**CCTTCTCTCAGGCTCACTCCCGTGCCTCTAAGGGGAGCAGTTGG
GGAGCGGGAGAGGCGGCTGTGATTTATGTGCTGGCTGTCAGAGGGCAGCACATCTCCATTCGTTGAAAAGTTGCGTCCCGCAACTTCAGACT
TAGAGTGCAAATGCTGGTACAGGGTGTACAAACGTGGAAGGGCAAAGAGAGTGCACGTGGGGGCATCTACACACAGAACGATCTTCTCATG
AAGGGGAAGGGTGTAGCAAGGGATACCAATTCGGCGAGTTCCTGCTCCTGGGTGGCGTCTCTGCTCCTCTTAGCGGATCCTCATCTCGGGCGCT
GTCCCGCCCTCTCGGGCGCGGGATCCGGCAGGTTGGCTGCTCGGGCGCTGTTGCGGTGCC**GATGTCCTCGGCCTACTACC**GTCGGCGC

UK23-F : **GGGAGAGAACCTTCGAGACA**
UK23-R : **GGTAGTGCCGAGGGACATC** (428 bp)

UK 44

GGGGATCATTCTACACCCTTCACTAGGAGAGTA**ATG**AAAGTTGTCATTTTAAATGTGTTTCAAGTTTTATTCTTTACCTTAGTGAATGGCGA
CTGCCCGGAGA**CTTTTCGTCGTTGGACTGATG**GAGACGAAATGTTTCATGGTTATAAAGCTGTAATTTGAGAATAAGGGTGAATGTTT
ATCAGGCTCGTCCAATTTGCAAAGCGCTGGGTGGAGATCTTGCCAGCATTCACAGCCAAGAAAGAAAATGATTTTGTATCAACAATGTGCCAGA
TTGAGTGGCAATTCAGTTGGATTGGAACCTTACATTTTACCACAGGATGACGGTTCAATCAAATGCCTTTTGGCTGATAAGAGTGACGCAAGT
TTTGGCGCATACAATTTCTTAGACGATACGGCAAGACAAAACGCCCGTGGGATACATCTGTTACACCTTCAATGAGGATGGAAGCAAATTA
ATTGCGTCAAACCTGGCGTCTA**ACTTGTGGAGTGAACAGGCC**TGCGACAATCGAATTAAGGAGTGCTTTGTAAAAATAAGCTGT**TAA**GG
AAATAAGAAGAGTGAAAATATAATTAATGATTTTAAACGAAAATATAAAAATATTTGGGAATATTTAAAAATTAATGCAAATAAAATATT
TTATAAC

Eiwit: MKVVILIVFQVLFVFTLVNGDCPGDFSSWTDGDNVHGYKAVISEYGLNVYQARPICKALGGDLASIHSEQEENDFVINNPVPLDSG
NSVWIGTYILPQDDGSIKCLLDKSDASFGAYNSLDDTARQNPWDTSVTPSIEDGSKINCVKLANLWSEQACDNRIKGVLCIKISC*

UK44-F : **CTTTTCGTCGTTGGACTGATG**
UK44-R : **GGCCTGTTCACTCCACAAGT** (400 bp)

UK 63

TCTCGTTAATAGCCATCCACTCGTTATT**CTTTCTCCGCTTCAACAACC**AACACCAACACCTTTTTtAATAATACCCAATCACA**ATG**CG
CTCTGCCATCATCCTCACTGTGCGCGCGACCGTGTGCTGCTGCTCGCACCTGCTCTCGAGCGCCTCGAGAAGCGGATGCTAAGGAGTGCCT
TCCGTGCGCTCCAGCATCTCCCGACCTAACCGCAATCCCTACTCCGACTCTTCGCTCGCAAGCTTCCCTCGCAAGCAGACCGATGCCATGA
CCATGACCGATCAATGTGTCATCCCGCGTCACTGGCTCCATGGCCAAGGAGTACACTTCTACGCTCCAAGCTCAGCTCTTGGTACATCGA
CCAGAAGGATGGCAT**CTCCTCTCTTCTCGAGGCT**GcAGCGAGCTCCCTGAGGTGAGCTCTCGCATCGCCGAACCTCAAGGAGACCGCCA
CCATTTGCGACAAGGTCACTTGGGCCAAGGAGACTGGCTCTTCTCTTCCAGCGGTGATGCTTCTCAGTCTAGCGACGCTGCTGCTTCTAGCTC
CACCGCCGACAAGGGTAACTGCTGGCGTCAACTCCAATCAAGGCTATTGGCGTCTCGCCGTCGCGGTCTTGTGTTGTCATGATGCTG**TAA**
AAAGCTTCATGCCTTATGGGAGGAATAATAACGGACAATACCCGTGGGTGACGGCGTCTGGCTTTTCGATTCATTTGGCCTGGTGTACTGGT
TCTAGTTTACTTTAAAAACACTCAATACAAGCGTTGTTGGCTACTG

Eiwit: MRSAILLVGATVVAASHPALERLEKRDACEKASVASSILPDLTAIPTDSSLASFLAKQTDAMTM
TDQCVI PAVTGSMAKEYTSYASKLSSWIDQKDGISSLEACSDVPEVSSRIABLKETATICTKVTWAKETGSSSSSGDASQSSDAAASSSTAD
KGNAAVNSIKAIGVLAVAGLAGVMML*

UK63-F : **CTTTCTCCGCTTCAACAACC**
UK63-R : **AGGCCTCGAGAAGAGAGGAG** (377 bp)

UK 64

CTATTCAATAATaAAAAAAGAATATTCCTTTCTTCTCGCAAATCTATATCTACAAATATA**ATG**TACAAAAATAAAATCTTCTGGCTTTT
TGTGTGATACTTCTACTTGGCAATTTATTTG**TCGTTTTCTGCTAAACCAAGGA**AGCCGATGACAAAGTCTCCACCAACGGAAGATCCTG
ACAATGGAGTTGATGACAAAAAGAAGAAAGGAAGAAAGAAAGACTGTCCACTTGGTAATACAACCATTATTCTATTGGTTCTGCTTGGTGTTC
TGCCTTTTGTATGCTAAATCGTGGCTGTTGTCTTATAATCTTTCTTCAATCTCAAATCTAAATTTGGAGAAAAATGGAAGTTGATTACAAAGGA
TATATGAATGGGCAGAAATGGATAAAGACTATTCAAAGC**TGGACTTGGGATCAGCATATC**AAACGAATAAGAAGAAGGGAGGAGTGAA
GAAAAAG**TGA**TGAAATAGGAATATAATAAATTTGATAGAGAATATTTGTTAGTTAGTAAATATATAAAATATTTATGTAATGTTATATTTGT
AAAAGAAATTTGATTGTAATgTACATTTTATTTCTTGGATTTTATAAATAATGTTGTatccaaaaaaacGGaCCGCCCTCCCTATAGT
GAG

Eiwit: MYKNKIFWLVFVILLGNLNFVVSAPKPRKPMTKSPPTEDPDNGVDDKKKKGKEEDCPLGNTTIIILLVLLGVAALLMLLIVAVVFIILF
FNLKSKLEKMEVDYKGYMKWAEMDKDYSKLDLGSAYQTNKKKGGVKKK*

UK64-F : **TCGTTTTCTGCTAAACCAAGGA**
UK64-R : **GATATGCTGATCCCAAGTCCA** (306 bp)

UK 65

GGGGACTTACCTAAAGTTTGGCTGCGCATctTTTatTTTTCGTTTTTCTCGTAGTAGGCCAACGTCGCAATTCGTTTTaTAAAGTCACTCGTTT
tTTTGTGTGACCTGCTTCGACTTCCCTCGtTTTTTCATTCACTAATAATTAATCCGatTTTTCTTACTTTCTCCAG**ATG**TATTTCTCCGC
GTGGTCTAAGATCGCCCTGCGGGTCTTTTTGCT**TCAGCTGCTGCTCAGACCTA**CAGCGAGTGCAACCCATGAAGAAGACATGCGATC
CCAACAAGGTTCTGCTTCTTCTTACTACTCGGTCGACTTACGAAGGGTCTGATGATGACAAATGGGAGGGAAGTGGCCATGGCACTGTCAA
GTATACTTCTGATGGTCCGAGTTCAGTGTGCTAAGCAGGGCAGCTCGCCTACCATTAGAGCAAGTGGTACATGTTCTTTGGCCGATGGAG
GTTACCTGAAGGCTGCGCCCGAACTGGTATCGTCTCATCTGCTGCTTCTTTCTGATGTTCTCG**ATGAGGTTGACTGGGAGTGG**CT
GGGAGGAAAGGACACAGACGTTTACAGCAACTACTATGGCAAAGGAAACGACGCGAGTATACCCGAAGCGCCACTTTCCGAGTCAACCGGGC
CAAGAGGAGTTCCACAATTATACCATTCACTGGACCAAGGATTCTTGGAGTGGTACATCAATGGCGTCCGTGTCCGCACGCTCAAGTATGCT
ATGCCCTTGGAGGAGAGAAGTACCTCAGACTCCCATGCGCGTCAAGTGGGCATCTGGGCTGGTGGCGATCCTGACAAATGCTGAGGGAAGTAT
CGAATGGGCTGGCGGAGAGACTGATTACAGTGCAGGCTTACACCATGACTGTTGAGAAAGATTGCGATGAGAACCTCAACCCCTGCTGAGAGC
TACACTTACAGCGATGAGACAGGCTCATACAAGAGCATTGAGTTTGTGAGAAAGGACAGTGGCAGTGACGATGATGACTCCTCATCAAGTGCCT
CTGAAGCCGCTCAAAGACCTCATCTAAGGCTTCTTCCAAGACTTCTTCTGAGTGGTCTTCACTACCAAGACTGCCACTGAGACTGACTCCGA
GTCCTCAACAACAGCATCGTCCGATGACTCTAGCGAGACTGAGAGCGCGACTTCAAGAAACAACAACGACAGACAACCAGCGCCGGTGAACCT
TCATCCGAGAGAGTGTGTCAGTACGCCCTCGACTACTGATGGTTCAACaAACAGCGCTGCTGGAAGCTGGCCCAAGATGTGGTTTGCCTTG
GATCGAcTTGCTGCTATGCTCA**TGA**TGTAATCTGAGGCTTTATTGTATACAGAGTGGCGAAGCTGTTGATTTGGCTTGGATACGT

Eiwit: MYFSAWSKIALAGLFASAAAQTYSECNPMKTKDPNKGGLASSYSVDFTKADDDNWEHTGHGTVKYTSDGAEFTVAKQGD
SPTIQSKWYMFGRMEVHLKAAPGTGIVSSVLLSDVLEVDWEWLGGKTDVQTNKYGKGNDAADTRSATFAVTAQEEFHNYTIHWTKDSCE
WYINGVAVRTLKYADALGGENYQTPMRVKLGIWAGGDPNAEGTIEWAGGETDYSAGPYTMTVQKIAIENLNPAESYTSYDETGSYKSI EFDE
KDSGSDDDSSSSASEASKTSKASSKTSSESTFTTKTATETDSESSTASSDDSSSETESADFKNNNAETTSAGATSSSSAAATPSTTDGST
NSAAGSWPKMWFALGSTALLCS*

UK65-F : **TCAGCTGCTGCTCAGACCTA**
UK65-R : **CCACTCCAGTCAACCTCAT** (330 bp)

UK 66

CG**ATG**CTTTTCATTCGCTCTTCTCTTTCGCACTTGTCTGCTGCTTCGTCGGCTTTTACTTTGCCTGATGTTAGTTCAACATCTGAACTTGCATCAG
CCATCAGTTCATCCGATGTTAGTTTCTATA**CCGCTTTTGAATACCATGCTT**CAATGCGGACCTAAATCCCATTTAATGCAATATTATCATAT
AAATACGTCAACGTTTATTTGGCTATTCGTGATACATTCGAAAATACTCAATATCAAGACACAACCTCGACAATGTTTACAAAAGAAATTTATCG
ATCAAGTGACTAAACTCGGTCATCAGCTGTACATGATGGACTTAAAAACTCGATTTAGATTACATGGAAGTTGTTTAGCTGTTTCATT
TAAACAATTGTCAACAGCTGATATCGAACAATTTCTTTCGACATTTCAAGATACAACCTGTTAACTATGCTCAATATGTAATTTAGCTA**ATAG**
TTTTGCTGGCCATTGGAGTCAAATGTTAAAGGTGATTTAATGCAATTCGTTAAAAACAATTGAAACAAGTCTTTCCCGAAGGTGATAC
AATTGCTTGTTCGATTAAGAAATCGAAAGTATTATCGATGAAGTCAATCATTGATTCAGTCAAAGGCATCAAAGATGATATTTCTCTC
ATCATCGAAAAAGCCAAAGCTATTCGTGATGATTTCAAACAATTCACAACAACAGTTCAGACATCAAAGATGGTAAATCTCGGAATTAGATG
GAACGAAAATTTCTCaAAAAAGCAAAGCCATCGTTGATaAtGCCAATATCATTGTGAAAACaATTCAAATCTTGTCAAAGCTAAACCATC
ACCAGCTGGTGACAAAATTTGTCGGTGAAATCGATCATGtTTTCGATGATTTAAtCTCGATCATGATCAAAATCAAGCATGaaAGGCGaAATC
tTCTCGATTATCGATGATGTCaATaACATCATCACCCTTTGCAACGACATTCGAGACAAGAAAATCGATTTctTCGATGGTGTAAACAAATG
TCGAATTCGGCAGCGATGGTGTGACAAAATCTATGAAGTTATGCCCACAACATCGGGCATTGAGCCCAAAATGTCGATCTTTTCGATACGAT
TTTCAAAGGTTGAGTGGTATTAGTTCGATGAAGGCAAGACAAAGTTCGATGAAGTCAATCGGAGGTGCAATTTGGTGGCATCGGTGGATTTGGA
AA**TAA**AtTTTCTCtCGtTtTTTTCTCTCTCTCTCTTcCaATAAATaTAAAT

Eiwit: MLSFALLFLAASAFTLDPVSSSTELASAISSSDCSFYALNTMLQCGPKSHLMQYSYKYCQ
RLLAIRDFTFENTYQDTRQCLQKFLDQVTKLQSAVTC DGLKLLDLDSHGSCLA VSKQLSTADIEQLSTFQDFTVNYAQLCKLANSFAGH
WSQIVKGDLMQFVKKQLKQVPEGDTIACSIKIEIESIIDEVESLIDSVKGIKDDILLIEKAKAIRDDFKTIQQTVQDIKDKI SELDGTKIIL
KKSKAIVDNANIIVKTIQNLVKAKPSPAGDKIVGEIDHVFDDLSIIDQIQALKEIFSIIDDVNNIITVCNDIRDKIDFFDGAQKIVEFGSD
GVDKIYEVIAATSSGIEATIVDLFDITFKGSVGLVDEGKDKVDEVIGGAIGGIGGFGK*

UK66-F : **CCGCTTTTGAATACCATGCTT**
UK66-R : **CAAATGGCCAGCAAAACTAT** (356 bp)

UK 68

aaaaaaaaaaaaaacggaccgctccctatagtgagtcgTATTACGGCCGggggAATTTGTAGAAGTT**ATG**GAGAACTCAGTATCTGTTCTT
TTGCTGAGTATTTGCTGTCTTGGTTCTGCTTTGGTTCTGCACCAAAGAGAGAACTGCATTCTGAGGACGCTGTAGAAAGTGACGGAAGTTGT
CCAGAACAT **CATCTGGAGGAGCCTTTCTG**TGAGGGCATGAATAAAGCGATGAGTTATGGTGATGAAGCAGGCGAATGTGAAGTTTAGA
TGATTCGTACTCAGATGAATCATGATATGTGCTGCTCTAATGAAGCTTTTGAGTGCAAAAATGGAATTCATTATGCAGGAAAATTCCTAT
GTGGAGCTTATAACCGACTAATGGAGGAATGGATGAGTAACATGCCCATGCAATCAAGTGGTGATCCAAATTTGGATTTTCGCAATCATGATGA
CTGTTTCATCATCAAGGTGCTATTGACTTCTCTAACTCT**TGCTCAAGTCTGGCAATGAC**CGTGAACCTCTTAATCTTGC GCGTAATATT
ATAAGTGACAAGAGAAAAGAAaTTGCTCAATTGGATGACTGGCTTGATAAAAAATaCCAAGATCAT**TAA**GACTACTAAATTCATCTGTGATA
TTGGTCTGTTGTCTATTTCACTATTAATTTATAAGGTTTGTAAATGTGTTCTTCCAGAACTaTAAGATCTATAGTAATTTGCTGTGCATCTAGTC
TATTTCCAAAAAAA

Eiwit: MRTQYLFCLLSICCLGSLGSAKRELHSEDAVESDGSCEPHHLEEFCEGMNKAMSYGDEAGECEGLDDSVTQMNHDMCCSN
EAFECKNGIHSCEENSIVESYNRLMEEWMSNMPMQSSGDPNLDFAIMMVTVHHQGAIDFSKLLKSGNDRELLNLARNIISAQEKEIAQLDDWL
KNNQDH*

UK68-F : **CATCTGGAGGAGCCTTTCTG**

UK68-R : **GTCATTGCCAGACTTGAGCA** (327 bp)

UK 69

GAcccccTATAGTGAGTTCGATTACgGCCGGGAAAATTTATTTAGATAAAG**ATG**GAGAGCTATCATATTGCTTGCTTGCCCTAT
TGGCTGTTGCCATTAGTTCCTCACTCAACACTTACGCTGATGGAACCTCTAATTTAAATTTGAACAAGAGGTACATGAGGGATCA
CCAATTTGGTATTTATATGAGGGACAAATTTGATCCAAGAGATGaAAAAATGAACAAGATCACTGCCTTCTGAGACTCGCTAA
CAAGTATATCCCAATCTTAGAATCCCTTGCTGGAAAGGAAACTGGTCTAAAGTATGAAAGAA**CATACCGTTTTCGCATTCTT**
TGGAGCCGTTGTAGACGTTTACACATACTTCCAGTTGATTGTTGGATGGAAAGTCAGTCCAGGTGGCTACACTACTGATAGAT
TcGATGTTACTTATACTCCATTTCGTATGGGGTGGTACTCTTCTAAGATTCAATGGAACCTTCaATCCTTGTATGGGCAGCACT
GAGATGGGTCTCCAATACGCTCCTCGCATATACCCAATTAGTCTACaGCTCTACAGAGCAGGAAAGATTTGCTTCCAGGGATC
ATACCGTGTGAGGCGATTAACTTCTACACAACTATATGCT**GCTCTGACTGAATGCCATGAT**GAGGCTTAGATGATAT
TATCGTCCAGCACATCGTATTGAACCTTCACATGCTCAGCTGTGAGACCAGTCAACaTCaCTCTATACAAcTCAATTTCaCAA
ACGCAATTGCAGGAGACTTCGTACCACAAACATGCATTAACTTC**TAA**GATCTAtGGTTGGAGATGCCATTTTTGTCTTTTAGT
CATATATATCGGATAAGATTATATGCGT

Eiwit: MRAIILLACLLAVAISPLNTYADGTLIKFEQEVHEGSPIGIYYEGQIDPRDEKMNKITAFLRLANK
YIPILES LAGKETGLKYERTYRFAFLGAVVDVYTYFQLIVGWKVPGGYTTDRFDVYTFVFWGGTLLRFNGTSILAMGSTEMGLQYVLAYTPI
SLQLYRAGKICFQGSYRVEAVNFLHKLAAALTECHDEVLDDIIIVQHIVLNFCTSAVRPVNITLYNINFNTNAIAGDFVPQTCINF*

UK69-F : **CATACCGTTTTCGCATTCTT**

UK69-R : **TCATGGCATTTCAGTCAGAGC** (331 bp)

UK 70

AGAGAAGAAggaGGaGGgAGGAGAAGGTGGTggTGGTgAAGAAGGACAAGAAGGaGGagaGAAGGAGCTAGAtGTTCAAATCA
AATTAGCtGgAAAAGCGAGGGAGAAATTCAAACAAATCGAAGCACAGGGACAAGCTGGGATTCCACAACCTGGGATTGGAATA
ACTCAACAGAAGACTCCATCCAA**ATG**GGACAAAAAAGTGAAGGAGGACCCGTAGAAGTTGTCAACAGACGCGTCGTGACGA
CGATTTGGAAGAGATGGAAGAAGAAATTCGATGTGAAGAATTTGATGGCAAAATTCAGAATATAGCTACGACAACGATGGAAC
CAAAAGAGAGGGAAAAGAATTTGGAGGAATTTGGAAGCTTTGAGATTAGAAGCGAAGAAATTTGAGGGAACAATTCGAAAAGACG
AATCAAATGGAATCGAGCGAGATGAGCGAAGAGAAGAAAAACAATTTGAGGAGGAATTCAAACAACCTCAAAGAAGAA**AGAGC**
AAAAGCCCCAAAAACAATTGgAAGAAGAACAAGCAGAAAGCAGCAGCaTCTATAAAACAATAcAGAGAAGgAAGACGTTCAAATA
GCAGAAGCTCATGCTTCGAAGATGGCAGCCAAATGGGAGAAAATTCACAAGAAGGAAGCGAAGAAAGCAGAGAAATCACGAAT
GCCTCAGAAATAAATTTTTGTAGTAGAGGAACaTCACCAATTTGTATTTTCCCTTATTCCTCCCTTTACCAaAAAACCTCAT
GGACAACAACAACAAAATTTCTCCTGTATCTGCTATTCGCTTTTTCAGCTTTTTTAACTGGATTAGCTATAGGACTTATGC
TTG**TACCACGTATTTTTGGGCGTTAA**AAATAAATATTTTTACGAGTTTTCTTTTTCCCCCTTTTCTTTCATTTTCATCTTTTT
TGCCATTTTTAAAGCAAAATATATAGTGTGCCAATTAATTTAAATATTTAGCATTCTTTTTTTGAAATTCATGAAATTTTC
ATAAAATTTGAATTTGCTATATGTCGTAAaTGCAATAATATTTTAATATTTTCGATAAATATTTCAATAAAAAGTA

Eiwit: MGQKSGRRTRRSQQTRRRRRFRDGRIRCEEFDGKIQEQYSYDNDGTRKREGKEFGGIGSFSEIRSEEFEGTIRKDESNGIERD
ERREEKTIIGGGIQTTRRKSksPKTIgRRTSRSSSIYQYREGRRSNRSsCFEDGSQMGENSQEGSEESREITNASEINFCSRGTSPICIFPY
SSPLPTKLMNNDNNKISPVSAIRLFSaFLTGLAIGLMLVPRIFGR-

UK70-F : **AGAGCAAAAGCCCCAAAAACA**

UK70-R : **ACGCCCAAAAATACGTGGTA** (359 bp)

UK 71

TCACCTCATTGTTCAGTTTAAaATTTCATTTTTGTAATAAAGACGAATTTTTGAAGTTGATTGTTAAGCTTAGCTAAAAGCTGTTT
TGGTGCGAAAGATAAAATGCTTACTATATAAGTTtCTTTAAATCAAGTTAaACTTCAAATAAATTACGTCTCGCACAAATTC
AGAATTCgTCGTGTTACAGCGTATTTCTTCG**ATG**GAAAGTTTTGTCTAATCTGCTTCATAGTCTCTCAGAAGCTATTCAAATTTGT
ACAACAGCAAGTTGACCAAAATcGTTCGAACGTGAACGCCGTGT **GGAAGCTACGCAAGAACGAC**GTATAGAGACCGAACAAGA
aCGGCATCCCCTACTAGTCTAGTAGTCCAACGAAGAGAGCAGAGAAAACAACAAGgACAAGTGACTCTGAGACTGATACAGTTC
AAACGTCTGAAACTTCCTCTGATGTAAGTTCGCGAAAGTTCTCGTAGTACTCAGGTAGAGCCCAGCAGAACTCAAGAAACCACT
TCAGAAGAGGATGATGATCCATATGAGATTGAAGAAATTGCTCGAATACATAAGGAGCTTGGGTAGTGTTCAGACCCTATTGC
ATCAGACATCATTTCTACTCGCTCAGCTC **GTATTTCGTTCTCCTCTCGG**ACTGGAGGTGAAAGGAGTTCCGTGTCTACGGC
AAACACTGTTGAAGCTCTCGAATGGGATGTAATAACTGCTAGAGTTGCCCGAGTGAAGAAAACCTATTGGCGAGTATTAATA
GTCCCTGCGTTGGTTGCAAATCCAATGTGACAGAAATGACTACTAATAATGACGATCTTCCAAGTGCAGTAGCGGTTGATAAT
TGAAGGATGAGTGATAATGAATGAATATAATACCATTTCATTTACAgTAAAATTCTGTGATAATTATATATTTCCCTAAATTTAT
TGTCATCTATAAACTCATTTATATGTAAGTACATATTTTCTAAAGTAAAAAAGGAGTAAAAAAGGAGTAAAAAAGGAGTAAAAA
TGAGTCGATTACGGCCGGGGGACCAGAGTCCAAGACAACGGTAGCGATCCACAAAAGTGGCTTGCCTCCCTTAAGGAAGTC
GtCAAACGTCCCTGCTTTGGTTCGAACGTTGCTACAGAC

Eiwit: MEVLSNLLHLSLEAIQIVQQVDQIVERERRVEATQERRIETEQRHPTTSSSANEESRETRTSDESETDTVQTSETSS
DVTAQSRSTQVEPSRTQETTSEEDDDPYEIEELLELEYIRSLGSVADPIASDIISTRARIRSPATGGERSVSTANTVEALEWDVITARVAPS
EENLLASINSPALVANPIVTEMTNNDDLPTAVAVDN*

UK71-F : **GGAAGCTACGCAAGAACGAC**
UK71-R : **CGCAGGAGGAGAACGAATAC** (337 bp)

UK 72

ACTAAAAAAGGCGCCGaCCTCCcTATAGTGTGATTACGGCCGggggAATATTATTAGCAATAGGGC
TTACT**ATG**AAGACAGCTTTTTGTTTTATCGTTGATTGTAATGAGCATGTTCACTGCTTCATCAACTCCAAGTATGAGTCAATT
TCAATGCTTAAAGGTATGTTTGGAGGAACATTTGGTACTATTAAGGATGACCTCAAAGAATGTACTAAGGATGGAAAAGATAT
AATAGACACGTCAGAGTTGCCGTACGTTATTTCAACATGGAGATTGAATCAAGTATCAAGTTAGGATTTACGGAATTGGAT
TAGCACTAGATGCAGTTCGAAGAGAAGTTGAAAACGTGAAGAaCCTACCAAACGTTGTCAAGAAGTTCAAAGAAATTCGTATG
AAATTCAAAGCAGCTGAGCAACTTGTAAATTAATTTGAAGAAGACATCCAATGGTTCGGAAAATCAATTCATAAAAACATCCA
TGAATTAGTCTCAGGTCATCAAGATAAAGATTTTACACAGCTGGTCATAAATTTGGgAGCTATCATCAAGGTC **GCACTTGCC**
AAGCTAGATGACCCAATCATTGATGTTGAGAATCTTTGGAAGGATTTCTTAAGGGAGCTCTACATGACGACTCTGTTGACA
TCAATGGATGCATCACTGATGCAGCTAATGTCTTAGAAGAGATCGAGAAAATGATCAACGAATTGATTGGCGGAGGATTTGTC
AATCCAGAGAAATTTCTTAGATTTCATTGATCTCATCACAGATTTCAGTAAAGAGTGTGCTCAATGTGAAAAGTCTCCACC
AGAAGTATGATTTCTTAGACTGGGCTACCcAAATGAAGGACATCAATGTAATGGAGACTAAACTATTCAAGGCATTCCTAT
ATTATCCACAGAGACTAAAGGATGACATCAAGAACCACAT **TGATGGATTCCAAGCTCAC**ACTTATGATATTAGTGGACACA
GCTTAGGTGATATCTTGTACATCTGTTCAAAGAGATTAAC **TAA**AAAGAGTAAATGAACTACGAATTTAGCTATGCATTAAT
TGTATGCTAACACACTTTAGAAaCAAAAAAAAAAAAAAAAAACGGCCGCTcTATAGTGTGAGTCT

Eiwit: MKTAFVLSLIVMSMFTASSTPTDESISMLKGMFEGTFTGTDKDLKECTKDGKDIIEHVRVAVRYFNMEIESSIKLGFYGI
GLALDAVPREVENCKNLNVVKNFKEIAMKFKAEEQLVINFEEDIQWFGKSIHKNIHLELVSGHQDKDFYTAGHNLGAIKVALAKLDDPIIDVE
NFLEGGFKGALHDDSDINGCITDAANVLEEIEKMINELIGGIVNPERKFLDFIDLITDSVKSVAQCEKSPPELMLILLDWTQMKDINVMETK
LFKAFLYPQRLKDDIKNTIDGFAHTYDISGHSGLDILYILFKEIN*

UK72-F : **GCACTTGCCAAGCTAGATGA**
UK72-R : **TGTGAGCTTGAATCCATCA** (400 bp)

UK 73

AAAAAAAAACGGCCGCTCCCTATAGTGTGATTACGGCCGGGGCTCTTCTAATAAATACTTCA**ATG**CAGCAACTTTTT
TGCTGTACAAACTTCTACTGGTGTTCGCATTTTCGCTGTTTTGTGTCGGTCATTTTTTTGACGGCATTATGTTGTAGTA
AAAAGAAGAAAAGATACCTACCCTTCACTCAAAGTGAATTTCTACAACAGGAAGATTCTCAAACGATACAAGTAACAGTA
AAAGAACCCTGCAGAAGTGTGTTCCAGCGTCAACAAAAGATAA **GCCTGCTGCCAGTAGTAAGG**TCGTAACCTCAA
CAGTCATCCCAGTTGAAAAAAGTTCAAAAATCTCCATCCTCAACCGAAGTTCCTCAAGGTGCAAAAACAAAAGCCCTCAACA
GCAACGAGCGCTACTTCTCTTCTACCATCAGCAGCTGCAGCAACTAAACCAAGTAAAACGACAAAACACTGAAGAAAAGCAA
AGAGCAGGGGAAAGTTGCAGAGACTGGTAAGAAGAAGGTTTCAGTCTGTTGCAGCACCCCAACACTaAAAAAGGAAAAG
ACGTTATATCATTGGTCCCC**ATGTCGCCGTCAACTCCTAC**ATCAGTACCAGCTGTCTCTTCGAAAGACAGCAGCGGAAC
ATCCAAAAACCTGACTGATACACCGAAAAACAGCTACTGCTGATGCTTCTGGAAGTTCGCAATATTCGAGGTTGAAGAAGATA
GCAGTGACGTCAGTATTGAAAAAAGAGGAAAAGCGCAGCGATAAGAGCGCAGGAAGACGGGCCAGAGGATGAAATGACAGAT
CCTGGTCTTATCATAACGCTGGCGGATATGAATGTCGACAAAGTGTCAAAGGGTGGT **TAA**TTGCAAGTTAACACGAAAG
CATCGCAAAAAGaGAATGCAGTGATTGAGAATATAATATTACTAGATCTCGTCTCAATATATATATGATTTGTC

Eiwit: MQQLFVCHKLLLVFAFSPVLLSVIFLTAALCCSKKKKIPTTSLKSEILQQEDSQTIQVTVKEPPAEVSVPASTKDKPAASSKVVN
STVIPVEKTVQKSPSSTEVPQGAQKQPSTATSATSLLPSAAAAATKPSKTKTLKKSKEQGKVAETGKKKVS SPVAAPPNTKKGKDVISLVPMS
STPTSVPTVSSKSDSGTSKNLTDTPKTATADASGSSAIFEVEEDSDVSI GKRRKSAIRAQEDGPEDEMTPGSHYHTLADMNVDKVFKRVG*

UK73-F : **GCCTGCTGCCAGTAGTAAGG**
UK73-R : **GTAGGAGTTGACGGCGACAT** (321 bp)

UK 74

TTTAAAAAaGTTTTTAAAGCAACATTAATAAC**ATG**CTGGTCTACAACAAAATAATTACTGGTTATTCTTTATCTG**TT**
GTTTATTTCTCGGTTAAAGGATATCCACAGGGACGCTCTGAACATCGTCCAGGTTGGGGGTGAGCTTAAGTAATGCAGC
TGATGACTTCTTTTCGCGGAAGTACTATCTGGGACCAGTGGGGTCGTCCTTATGTCCATGGAGTTTGGCATACTGGAATGGGAA
TCATTAACAATAATCCATATGAGATTAGGCGTGTGCCACACAATTTGGACGCTCTGGTTATGGAGGTGGTGGAAATGGCCAA
TCTGGTGC GGGAATATAACAAC**TAA**TCATA**TAAACCTGAATAATTTTCGGAAAA**AGAAATTGAGTTAAATCAAAAAATATAA
TTTTTATTTTTTCAACATTATTCAAAAATTTGAATTAGTTACTCGATTATAAGTAAATTTAAAAATGATTCTTTATTA
CATAAATAtAaTTtTaTtCAAAAAAaAAAAAaACGACCGCTCCCTATATGAGTCGtAttAcGcGgggACCC

Eiwit: MLVYNKIITGLFFILLFISSVKYQPQGRLEHRPGWVLSNAADDFRSTIWDQWGRPYVHGVWHTGMGI
INNNPYEIRRAATQFGRLLGGGWNQSGRGIYN*

UK74-F : **TTGTTTATTTCTCGGTTAAAGG**
UK74-R : **TTTCCGAAAATTATTCAGGTTTA** (301 bp)

UK 75

ACTCTGGCATGAGTTGTGACCAAATATTAATGAAAAATTTATTTAAAAaTTAAAAAATTTACCACCTGAATTATTATGTAA
TTTGCCTATTTTT**ATG**CCCCGTGATATAAGATGGTTTAGAATAGATGTTTCAAAAAATTTAATATTTTGGTCATAAAAAATCT
TGCGAAAATGGTTAATTTATATAAGTCTAGTTAGAGTTGAAGTAGAGAGTGTTTTATCAGAAATTAT**TGGTCGTTTTGCTGA**
GACTGATTCAAAGCCGTACAATTTTCGTGTTAAGGATAATATCTCCTTGTCAACAAAGCTCGATTCAATTTATCTTTGGTTG
TTGGACTTGAACATGATTTCCGTCAAAGTCTGTCCATTCAAAAATAAATTGGCTGAACCCTGGTTAAGAGAATTTCCACGC
CGAAGTGGATGCGTCTGGCCTGAGAAAGAGCACAGTAAATTGAACGACAATACGGCAGAGACTGTACTTAATCGATTGAAAA
CAAGAAAAGAATAATAAGAGAAATATTTGAATTTGTCGTTAATTTTGTGGGAAACTTCAGAAAAGGAATATTTGCATTGA
ATGGTTGTGT**TTATAGTGTGCTGGATGCCG**TAAATGATTTCTTCACTTATTACAACGATCCTAAGAACCCT**TGA**GCGATAT
TTTAAAGAGCAGTGCCTTGATTTTAAAAAATTACATTTGTTGTCTTAAATTTAAAAAaTTTTAAaCcAAAAAaAAAAA
AaacggCCGACCTCCcTATAGTGTGTCGATTACGGCCGGGG

Eiwit: MPRDIRWFRIDVSKIFNILVIKFLRKWLIYISLVRVEVESVLSEIIGRFAETDSKPYNFRVKDNISLSTKLDISIYSLVVGL
EHVFPKSVFPKNLAEPWLREFFRRTGCVWPEKEHSLKNDNTAETVLRNFENKRIIREIFEVFNVFGKLEPEKELFALNGCVYSLDAVNDF
FTYYNDPKNR*

UK75-F : **TGGTCGTTTTGCTGAGACTG**
UK75-R : **CGGCATCCAGCACACTATAA** (377 bp)

UK 76

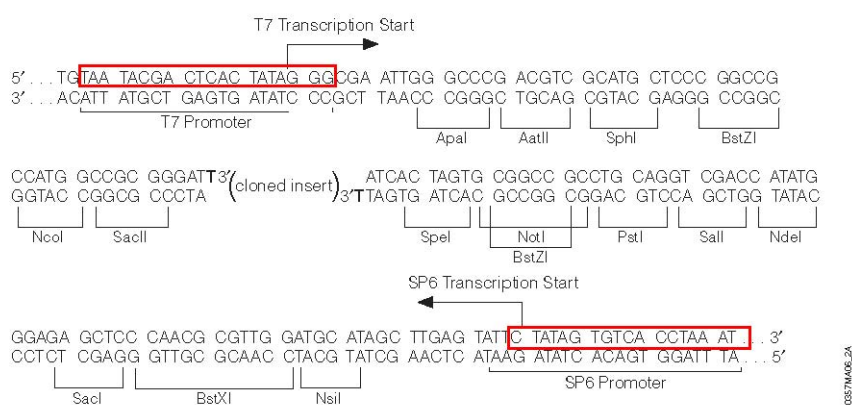
TCCGATTGAGTATATAGGAAATCTAG**TGCCCTGGTCCAAACTACCAT**CCAACACCTCAAGGCATATTTATCTTGCT**ATG**GC
CTTCGCTGCTTCCGGTGATGGAACCACGTCCTCCGACCATTTCATGGCATGCAGGGTCTCTCCAGCTCACCAATTATATGCTGT
CATATGATTTAGACCCACGCAATCATCGTGCAAAAAaTGAACAATTTTCATGGCTTGTACGTAACCTGCTTTAGTAAAGATGAT
GAAGTTCTAAGCAAGCTGATTTGTTGAGAtCAAgATGGgAAggTTTGCAAACTGCACATAGCAACTCTATAACAACCTCTG
TAATATGATGAAGTCAAAGAATTC**ATCAATTCAGCCACAATTTGC**TGTAATATTATTTATAAATTATATGTCATAAATCTC
TTTTGATAAAGAACCCTTTCTGGAATCATTACAAGGaGAAGTTTTGAAGGATCTTTACATGAAAAAAGGAGACGTTTGGATGT
CCATTAAGGAATGGAGAAAGAAAGAGAGAAAT**TAA**AATTTTAAACATGTATATATAAATTAAAGATTTTtTAATCtAGT
ATTTTTTtTaAAAAATTTAACAAACT

Eiwit: MAFAASGDGTTSSDHSWHAGSLQLTNYMLSYDLDPNRHRAKNETISWLVNRNCFKDDDEGSKQADLLRSRWEGLQTAHSNSYN
NFCNMVEVKEFINSATICCNIIYKLYVNNFDFKEPFLSLQGEVLKDLYMKKGDVWMSIKEWKKEGEI*

UK76-F : **TGCCTGGTCCAAACTACCAT**
UK76-R : **GCAAATTGTGGCTGAATTGAT** (350 bp)

Bijlage D

Multikloneringsites pGEMt, pDEST22 en pDEST32



Figuur D.0.1: Promotor en multikloneringsite van de pGEM-T vector [69]. SP6- (TATTTAGGTGACACTATAG) (rechts onder) en T7- (TAATACGACTCACTATAGGG) (links boven) primers zijn weergegeven in een kader.

1661 CCTTTCTTCC TTGTTTCTTT TTCTGCACAA TATTTC AAGC TATACCAAGC ATACAATCAA CTCCAAGCTT

1731 ^{Nuclear Localization Signal}
 ATG CCC AAG AAG AAG CGG AAG GTC TCG AGC GGC GCC AAT TTT AAT CAA AGT GGG AAT
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Ser Gly Ala Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn

1788 ^{GAL4 DNA Activation Domain}
 ATT GCT GAT AGC TCA TTG TCC TTC ACT TTC ACT AAC AGT AGC AAC GGT CCG AAC CTC
 Ile Ala Asp Ser Ser Leu Ser Phe Thr Phe Thr Asn Ser Ser Asn Gly Pro Asn Leu

1845
 ATA ACA ACT CAA ACA AAT TCT CAA GCG CTT TCA CAA CCA ATT GCC TCC TCT AAC GTT
 Ile Thr Thr Gln Thr Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala Ser Ser Asn Val

1902
 CAT GAT AAC TTC ATG AAT AAT GAA ATC ACG GCT AGT AAA ATT GAT GAT GGT AAT AAT
 His Asp Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser Lys Ile Asp Asp Gly Asn Asn
 Suggested forward sequencing/PCR primer

1959
 TCA AAA CCA CTG TCA CCT GGT TGG ACG GAC CAA ACT GCG TAT AAC GCG TTT GGA ATC
 Ser Lys Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr Asp Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Phe Gly Ile

2016
 ACT ACA GGG ATG TTT AAT ACC ACT ACA ATG GAT GAT GTA TAT AAC TAT CTA TTC GAT
 Thr Thr Gly Met Phe Asn Thr Thr Thr Met Asp Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp

2073
 GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG GGT GGG TCG AAT CAA ACA AGT
 Asp Glu Asp Thr Pro Pro Asn Pro Lys Lys Glu Gly Gly Ser Asn Gln Thr Ser
 2128 attB1 3951 attB2

2127 TTT TAC AAA AAA GCA GNN ACCCAGCTTT CTTGTACAAA GTGGTTTGAT
 AAC ATG TTT TTT CGT CNN cDNA INSERT TGGGTCGAAA GAACATGTTT CACCAAACATA
 Leu Tyr Lys Lys Ala ...

3971 GGCCGCTAAG TAAGTAAGAC GTCGAGCTCT AAGTAAGTAA CGGCCGCCAC CGCGGTGGAG CTTTGGACTT

Suggested reverse sequencing/PCR primer

4041 CTTTCGCCAGA GTTTGGTCA AGTCTCCAAT CAAGGTTGTC GGCTTGTCTA CCTTGCCAGA AATTTACGAA

Figuur D.0.2: Multikloneringssite van de pDEST22 vector [109]

1511 TTTCTGCACA ATATTTCAAG CTATACCAAG CATAACAATCA ACTCCAAGCT TGAAGCAAGC CTCTGAAAG

^{GAL4 DNA Binding Domain}

1581 ATG AAG CTA CTG TCT TCT ATC GAA CAA GCA TGC GAT ATT TGC CGA CTT AAA AAG
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Leu Lys Lys
 Suggested forward sequencing/PCR primer

1635 CTC AAG TGC TCC AAA GAA AAA CCG AAG TGC GCC AAG TGT CTG AAG AAC AAC TGG
 Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp

1690 GAG TGT CGC TAC TCT CCC AAA ACC AAA AGG TCT CCG CTG ACT AGG GCA CAT CTG
 Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu

1743 ACA GAA GTG GAA TCA AGG CTA GAA AGA CTG GAA CAG CTA TTT CTA CTG ATT TTT
 Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe

1797 CCT CGA GAA GAC CTT GAC ATG ATT TTG AAA ATG GAT TCT TTA CAG GAT ATA AAA
 Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys

1851 GCA TTG TTA ACA GGA TTA TTT GTA CAA GAT AAT GTG AAT AAA GAT GCC GTC ACA
 Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr

1905 GAT AGA TTG GCT TCA GTG GAG ACT GAT ATG CCT CTA ACA TTG AGA CAG CAT AGA
 Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg

1959 ATA AGT GCG ACA TCA TCA TCG GAA GAG AGT AGT AAC AAA GGT CAA AGA CAG TTG
 Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu

2013 ^{2044 attB1}
 ACT GTA TCG TCG AGG TCG AAT CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCT GNN
 TGA CAT AGC AGC TCC AGC TTA GTT TGT TCA AAC ATG TTT TTT CGA CNN cDNA INSERT
 Thr Val Ser Ser Arg Ser Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala ---

^{3867 attB2}
 ACCCAGCTTT CTTGTACAAA GTGGTTTGAT GGCCGCTAAG TAAGTAAGAC GTCGAGCTCT AAGTAAGTAA
 TGGGTCGAAA GAACATGTTT CACCAAACATA
 Suggested reverse sequencing/PCR primer

3927 CGGCCGCCAC CGCGGTGGAG CTTTGGACTT CTTGCCAGA GTTTGGTCA AGTCTCCAAT CAAGGTTGTC

3997 GGCTTGTCTA

Figuur D.0.3: Multikloneringssite van de pDEST32 vector [110]

Bijlage E

REST-analyse RNAi-experiment (UK50): eerste biologische replica

E.1 Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7217	1,152				
ACT2	REF	0,6883	0,868				
UK50	TRG	0,8867	1,105	1,105 - 1,105	1,105 - 1,105	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,105 (S.E. range is 1,105 - 1,105).

UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7217	0,325	0,325 - 0,325	0,325 - 0,325	0	DOWN
ACT2	REF	0,6883	0,245	0,245 - 0,245	0,245 - 0,245	0	DOWN
UK50	TRG	0,8867	0,312	0,312 - 0,312	0,312 - 0,312	0,485	

E.2 Staal: UK50A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,9283	0,878				
ACT2	REF	0,755	1,139				
UK50	TRG	0,8933	1,992	1,992 - 1,992	1,992 - 1,992	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,992 (S.E. range is 1,992 - 1,992).
UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,9283	0,689	0,689 - 0,689	0,689 - 0,689	0	DOWN
ACT2	REF	0,755	0,894	0,894 - 0,894	0,894 - 0,894	0	DOWN
UK50	TRG	0,8933	1,563	1,563 - 1,563	1,563 - 1,563	0	UP

E.3 Staal: UK50A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,9333	0,816				
ACT2	REF	0,7533	1,225				
UK50	TRG	0,9167	1,579	1,579 - 1,579	1,579 - 1,579	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,579 (S.E. range is 1,579 - 1,579).
UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,9333	2,688	2,688 - 2,688	2,688 - 2,688	0	UP
ACT2	REF	0,7533	4,033	4,033 - 4,033	4,033 - 4,033	0,487	
UK50	TRG	0,9167	5,197	5,197 - 5,197	5,197 - 5,197	0	UP

E.4 Staal: UK50B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8017	0,93				
ACT2	REF	0,6933	1,075				
UK50B1	TRG	0,7867	2,204	2,204 - 2,204	2,204 - 2,204	0	UP

Interpretation

UK50B1 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2,204 (S.E. range is 2,204 - 2,204).
UK50B1 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8017	0,456	0,456 - 0,456	0,456 - 0,456	0,492	
ACT2	REF	0,6933	0,527	0,527 - 0,527	0,527 - 0,527	0	DOWN
UK50B1	TRG	0,7867	1,08	1,080 - 1,080	1,080 - 1,080	0,492	

E.5 Staal: UK50B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8067	0,845				
ACT2	REF	0,6917	1,184				
UK50	TRG	0,81	1,759	1,759 - 1,759	1,759 - 1,759	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,759 (S.E. range is 1,759 - 1,759).
UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8067	1,543	1,543 - 1,543	1,543 - 1,543	0,485	
ACT2	REF	0,6917	2,162	2,162 - 2,162	2,162 - 2,162	0	UP
UK50	TRG	0,81	3,212	3,212 - 3,212	3,212 - 3,212	0,485	

Bijlage F

REST-analyse RNAi-experiment (UK50 en UK52): tweede biologische replica

F.1 Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK50

Relative Expression Results

Parameter Value

Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8533	0,733				
ACT2	REF	0,7775	1,364				
UK50	TRG	0,8017	7,312	7,312 - 7,312	7,312 - 7,312	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 7,312 (S.E. range is 7,312 - 7,312).

UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8533	0,07	0,070 - 0,070	0,070 - 0,070	0	DOWN
ACT2	REF	0,7775	0,131	0,131 - 0,131	0,131 - 0,131	0	DOWN
UK50	TRG	0,8017	0,702	0,702 - 0,702	0,702 - 0,702	0,509	

F.2 Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK52

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8533	0,733				
ACT2	REF	0,7775	1,364				
UK52	TRG	0,9475	11,504	11,504 - 11,504	11,504 - 11,504	0	UP

Interpretation

UK52 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 11,504 (S.E. range is 11,504 - 11,504).

UK52 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,8533	0,07	0,070 - 0,070	0,070 - 0,070	0	DOWN
ACT2	REF	0,7775	0,131	0,131 - 0,131	0,131 - 0,131	0	DOWN
UK52	TRG	0,9475	1,105	1,105 - 1,105	1,105 - 1,105	0,487	

Bijlage G

REST-analyse RNAi-experiment (UK8)

G.1 Staal: water-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
ACT2	REF	0,785	1,332				
GADPH	REF	0,8733	0,726				
CYN5	REF	0,7783	1,034				
UK8	TRG	0,715	1,176	1,176 - 1,176	1,176 - 1,176	0	UP

Interpretation

UK8 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 1,176 (S.E. range is 1,176 - 1,176).

UK8 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
ACT2	REF	0,785	1,652	1,652 - 1,652	1,652 - 1,652	0	UP
GADPH	REF	0,8733	0,901	0,901 - 0,901	0,901 - 0,901	0	DOWN
CYN5	REF	0,7783	1,283	1,283 - 1,283	1,283 - 1,283	0,487	
UK8	TRG	0,715	1,459	1,459 - 1,459	1,459 - 1,459	0	UP

G.2 Staal: UK8A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,7883	1,304				
GADPH	REF	0,835	0,789				
CYN5	REF	0,7442	0,972				
UK8	TRG	0,7717	1,033	1,033 - 1,033	1,033 - 1,033	0,502	

Interpretation

UK8 sample group is not different to control group. P(H1)=0,502

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,7883	4,277	4,277 - 4,277	4,277 - 4,277	0	UP
GADPH	REF	0,835	2,588	2,588 - 2,588	2,588 - 2,588	0	UP
CYN5	REF	0,7442	3,186	3,186 - 3,186	3,186 - 3,186	0	UP
UK8	TRG	0,7717	3,388	3,388 - 3,388	3,388 - 3,388	0,485	

G.3 Staal: UK8A-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,7867	0,97				
GADPH	REF	0,8583	1,1				
CYN5	REF	0,7392	0,937				
UK8	TRG	0,7567	0,843	0,843 - 0,843	0,843 - 0,843	0,505	

Interpretation

UK8 sample group is not different to control group. P(H1)=0,505

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,7867	2,58	2,580 - 2,580	2,580 - 2,580	0	UP
GADPH	REF	0,8583	2,927	2,927 - 2,927	2,927 - 2,927	0	UP
CYN5	REF	0,7392	2,492	2,492 - 2,492	2,492 - 2,492	0	UP
UK8	TRG	0,7567	2,242	2,242 - 2,242	2,242 - 2,242	0	UP

G.4 Staal: UK8B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: GFP-siRNA-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,8192	0,869				
GADPH	REF	0,815	1,424				
CYN5	REF	0,7767	0,807				
UK8	TRG	0,7467	2,855	2,855 - 2,855	2,855 - 2,855	0	UP

Interpretation

UK8 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2,855 (S.E. range is 2,855 - 2,855).
UK8 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,8192	0,171	0,171 - 0,171	0,171 - 0,171	0	DOWN
GADPH	REF	0,815	0,28	0,280 - 0,280	0,280 - 0,280	0	DOWN
CYN5	REF	0,7767	0,159	0,159 - 0,159	0,159 - 0,159	0	DOWN
UK8	TRG	0,7467	0,562	0,562 - 0,562	0,562 - 0,562	0	DOWN

G.5 Staal: UK8B-siRNA-behandelde nematoden - Controle: water-behandelde nematoden - Geamplificeerd gen: UK8

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,8192	0,919				
GADPH	REF	0,8383	1,621				
CYN5	REF	0,7717	0,672				
UK8	TRG	0,7317	2,072	2,072 - 2,072	2,072 - 2,072	0	UP

Interpretation

UK8 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 2,072 (S.E. range is 2,072 - 2,072).
UK8 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Act2	REF	0,8192	0,171	0,171 - 0,171	0,171 - 0,171	0	DOWN
GADPH	REF	0,8383	0,302	0,302 - 0,302	0,302 - 0,302	0	DOWN
CYN5	REF	0,7717	0,125	0,125 - 0,125	0,125 - 0,125	0	DOWN
UK8	TRG	0,7317	0,386	0,386 - 0,386	0,386 - 0,386	0	DOWN

Bijlage H

Infectieproef met UK8-siRNA-behandelde nematoden

H.0.1 Aantal gallen geïnduceerd op de wortels

	siRNA 8A	siRNA 8B	siRNA GFP	water
	0	3	0	0
	2	3	2	1
	4	7	2	2
	4	7	5	3
	5	9	6	4
	5	9	8	8
	6	10	10	11
	9	12	11	15
gemiddelde	4.375	7.5	5.5	5.5
standaard deviatie	2,669269563	3,207134903	4	5,318431563

H.0.2 SPSS-analyse van de data in sectie H.0.1

H.0.2.1 Normaliteit

Tests of Normality							
VAR00001		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00002	8A	,194	8	,200*	,966	8	,868
	8B	,188	8	,200*	,916	8	,401
	GFP	,184	8	,200*	,946	8	,671
	water	,236	8	,200*	,900	8	,286

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

H.0.2.2 Homoscedasticiteit

Test of Homogeneity of Variances

VAR00002

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,230	3	28	,107

H.0.2.3 Vergelijken van gemiddelden (Tukey-gecorrigeerde one way ANOVA)

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
8A	8B	-3,12500	1,96368	,400	-8,4864	2,2364
	GFP	-1,12500	1,96368	,939	-6,4864	4,2364
	water	-1,12500	1,96368	,939	-6,4864	4,2364
8B	8A	3,12500	1,96368	,400	-2,2364	8,4864
	GFP	2,00000	1,96368	,740	-3,3614	7,3614
	water	2,00000	1,96368	,740	-3,3614	7,3614
GFP	8A	1,12500	1,96368	,939	-4,2364	6,4864
	8B	-2,00000	1,96368	,740	-7,3614	3,3614
	water	,00000	1,96368	1,000	-5,3614	5,3614
water	8A	1,12500	1,96368	,939	-4,2364	6,4864
	8B	-2,00000	1,96368	,740	-7,3614	3,3614
	GFP	,00000	1,96368	1,000	-5,3614	5,3614

Bijlage I

Vergelijking van expressie van effectors tussen verschillende levensstadia van de nematode

I.1 Expressie van UK50

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7517	2,968				
CYN5	REF	0,7675	0,754				
Tub	REF	0,8983	0,447				
UK50	TRG	0,7875	1,137	1,137 - 1,137	1,137 - 1,137	0	UP

Interpretation

UK50 is UP-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of **1,137** (S.E. range is 1,137 - 1,137). UK50 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7517	0,256	0,256 - 0,256	0,256 - 0,256	0	DOWN
CYN5	REF	0,7675	0,065	0,065 - 0,065	0,065 - 0,065	0,509	
Tub	REF	0,8983	0,038	0,038 - 0,038	0,038 - 0,038	0	DOWN
UK50	TRG	0,7875	0,098	0,098 - 0,098	0,098 - 0,098	0	DOWN

I.2 Expressie van UK52

Relative Expression Results

Parameter Value
Iterations 2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7517	2,968				
CYN5	REF	0,7675	0,754				
Tub	REF	0,8983	0,447				
UK52	TRG	0,8433	0,302	0,302 - 0,302	0,302 - 0,302	0	DOWN

Interpretation

UK52 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of **0,302** (S.E. range is 0,302 - 0,302).
UK52 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
EEF1A	REF	0,7517	0,256	0,256 - 0,256	0,256 - 0,256	0	DOWN
CYN5	REF	0,7675	0,065	0,065 - 0,065	0,065 - 0,065	0,487	
Tub	REF	0,8983	0,038	0,038 - 0,038	0,038 - 0,038	0	DOWN
UK52	TRG	0,8433	0,026	0,026 - 0,026	0,026 - 0,026	0	DOWN

Bijlage J

Transiënte expressie

J.1 Scores

Tabel J.1.1: Scores toegekend bij de evaluatie van de negatieve controles horende bij de *immuno suppression assay* met UK8 en UK28

blad	Avr	R	GFP	UK8	UK28
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0

Tabel J.1.2: Scores toegekend bij de evaluatie van de negatieve controles horende bij de *immuno suppression assay* met UK50 en UK52

blad	Avr	R	GFP	UK50	UK52
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0

Tabel J.1.3: Scores toegekend bij de evaluatie van de *immuno suppression assays* met potentiële effectors UK8 en UK28

blad	R + Avr + UK8	R + Avr + UK28	R + Avr + GFP (positieve controle)	R + Avr + lege vector (positieve controle)
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	1	1	1	1
6	1	1	1	1
7	1	1	1	1
8	1	1	1	1

9	1	1	1	1
10	0	0	0	0
11	1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	1	1	1	1
18	0	0	0	0
19	1	1	1	1
20	1	1	1	1
21	1	1	1	1
22	1	1	1	1
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	1	1	1	1
26	1	1	1	1
27	1	1	1	1
28	1	1	1	1
29	1	1	1	1
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0
32	1	1	1	1
22	1	1	1	1
34	1	1	1	1
35	1	1	1	1
36	1	1	1	1
37	1	1	1	1
38	1	1	1	1
39	0	0	0	0
40	1	1	1	1
41	1	1	1	1
42	1	1	1	1
43	1	1	1	1
44	1	0	1	1

Tabel J.1.4: Scores toegekend bij de evaluatie van de *immuno suppression assays* met potentiële effectors UK50 en UK52

blad	R + Avr + UK50	R + Avr + UK52	R + Avr + GFP (positieve controle)	R + Avr + lege vector (positieve controle)
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	1	1	1	1
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	1	1	1	1
10	1	1	1	1
11	0	0	0	0
12	1	1	1	1
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	1	1	1	1
19	1	1	1	1
20	1	1	1	1
21	1	1	1	1
22	1	1	1	1
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	1	1	1	1
26	1	1	1	1
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	1	1	1	1
30	1	1	1	1
31	1	1	1	1
32	1	1	1	1
33	1	1	1	1
34	1	1	1	1
35	0	0	0	0
36	1	1	1	1

37	1	1	1	1
38	1	1	1	1
39	0	0	0	0
40	1	1	1	1
41	1	1	1	1
42	1	1	1	1
43	0	0	0	0
44	1	1	1	1
45	1	1	1	1
46	0	0	0	0
47	1	1	1	1
48	1	1	1	1
49	1	1	1	1
50	1	1	1	1
51	0	0	0	0
52	1	1	1	1

J.2 Statistische analyse

J.2.1 Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weergegeven in tabel 4.9 (UK8)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,000 ^a	1	1,000		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,000	1	1,000		
Fisher's Exact Test				1,000	,631
N of Valid Cases	88				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,00.

b. Computed only for a 2x2 table

J.2.2 Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weergegeven in tabel 4.10 (UK28)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,104 ^a	1	,747		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,104	1	,747		
Fisher's Exact Test				1,000	,500
N of Valid Cases	88				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,50.

b. Computed only for a 2x2 table

J.2.3 Output van de statistische analyse (Chi-kwadraat testen) in SPSS van de dataset weer-gegeven in tabel 4.11 (UK50)

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,000 ^a	1	1,000		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,000	1	1,000		
Fisher's Exact Test				1,000	,592
N of Valid Cases	104				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 12,00.

b. Computed only for a 2x2 table