

Alle genen van *Phytophthora* op een rij: verschillen, overeenkomsten en gastheerspecificiteit

H.J.G. Meijer, F. Govers en R.H.Y. Jiang

Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit, Binnenhaven 9, 6709 PD Wageningen.

Genomics is een discipline die in de laatste jaren een enorme opmars heeft gemaakt. De blauwdruk van het leven is vastgelegd in DNA. De DNA volgorde (sequentie) bepaalt wat voor soort eiwitten een organisme kan maken en daaruit kunnen dan weer functies en eigenschappen afgeleid worden. Inmiddels is de DNA sequentie van het volledige genoom van een groot aantal organismen bekend onder andere van diverse ziekteverwekkende micro-organismen. In 2004 werd de DNA volgorde van het genoom van twee *Phytophthora* soorten vastgesteld. Dit zijn *Phytophthora sojae*, de veroorzaker van wortel- en stengelrot op sojaboon, en *Phytophthora ramorum*, een soort die in 2000 voor het eerst beschreven is en die verantwoordelijk is voor 'Sudden Oak Death' (SOD). SOD is een verwoestende ziekte die vooral in het westen van de Verenigde Staten veel schade veroorzaakt. In tegenstelling tot *P. sojae* heeft *P. ramorum* een brede waardplantenreeks en vele bomen en struiken in hun natuurlijke habitat zijn het slachtoffer.

Met de twee genoomsequenties hebben we grofweg alle genen van *Phytophthora* op een rij, en kunnen we het genoom en het proteoom (alle eiwitten) van twee nauw verwante soorten vergelijken. Wat zijn de verschillen en de overeenkomsten, en vinden we aanknopingspunten voor gastheerspecificiteit? Ook kunnen we de genenpool van *Phytophthora* vergelijken met de genenpool in andere plantenpathogenen en kijken of er op DNA- en eiwitniveau essentiële verschillen zijn tussen echte schimmels en oömyceten, de taxonomische groep waartoe *Phytophthora* behoort.

Plantenpathogenen beschikken over een breed scala aan eiwitten die een rol spelen in de interactie met hun gastheren. Vooral eiwitten die uitgescheiden worden zijn uitermate interessant. Dit kunnen effector moleculen zijn die door de plant signaleerd worden met als gevolg dat de plant zijn afweer gaat activeren. Dit kunnen ook enzymen zijn die bijvoorbeeld de celwand afbreken en zo het pathogeen helpen bij de infectie. Uit het proteoom van *P. sojae* en *P. ramorum* zijn alle gesecreteerde eiwitten geselecteerd (in totaal 1464 resp. 1188) en onderzocht op sequentie diversiteit, genoomorganisatie en expansiegedrag van de genfamilies. Meer dan 80% van de gesecreteerde eiwitten behoren tot families en de genen lig-

gen vaak geclusterd in het genoom. In de twee soorten bleken de grootte and het expansiegedrag van een aantal genfamilies te verschillen. Ook bleken sommige van de onderzochte genen gelokaliseerd te zijn in gebieden waar, in vergelijking met de andere soort, veel inserties en deleties voorkomen terwijl de aangrenzende gebieden in de twee soorten vergelijkbaar zijn. Deze 'hotspots' zijn bijzonder interessant om nader te onderzoeken. Ook werden eiwitten gevonden die uniek zijn voor de ene soort of voor de andere en deze verschillen zouden de basis kunnen zijn voor gastheerspecificiteit.

Diagnostic application of padlock probes – multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays

Marianna Szemes, Peter Bonants, Marjanne de Weerd, and Cor D. Schoen

Plant Research International B.V., Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen E-mail: cor.schoen@wur.nl

Padlock probes (PLP) are long oligonucleotides, whose ends are complementary to adjacent target sequences. Upon hybridisation to the target, the two ends are brought into contact, allowing PLP circularisation by ligation. PLPs provide extremely specific target recognition, which is followed by universal amplification and microarray detection. Since target recognition is separated from downstream processing, PLPs enable the development of flexible and extendable diagnostic systems, targeting diverse organisms. To adapt padlock technology for diagnostic purposes, we optimised PLP design to ensure high specificity, eliminating ligation on non-target sequences under real-world assay conditions. We designed and tested 11 PLPs to target various plant pathogens at the genus, species and sub-species levels, and developed a prototype PLP-based plant health chip. Excellent specificity was demonstrated towards the target organisms. Assay background was determined for each hybridisation using a no-target reference sample, which provided reliable and sensitive identification of positive samples. A sensitivity of 5 pg genomic DNA and a dynamic range of detection of 100 were observed. The developed multiplex diagnostic system was validated using genomic DNAs of characterized isolates and artificial mixtures thereof. The demonstrated system is adaptable to a wide variety of applications ranging from pest management to environmental microbiology.

VOORDRACHTEN