

# Ontwikkeling van een DNA 'array' voor multiplex detectie en kwantificatie van plantenpathogenen

*Bart Lievens*

Op 5 juli 2006 promoveerde Bart Lievens aan de Katholieke Universiteit Leuven op het proefschrift getiteld 'Development of a DNA array for multiplex detection and quantification of plant pathogens'. Promotoren waren Prof. Dr. B. Cammue van de faculteit Bio-ingenieurswetenschappen (K.U. Leuven, België) en Dr. ir. B. Thomma van de leerstoelgroep Fytopathologie (Wageningen Universiteit). Het werk beschreven in dit proefschrift werd voor een belangrijk deel uitgevoerd bij Scientia Terrae Research Institute (Sint-Katelijne Waver, België).

## Inleiding

In ieder gewas kunnen tal van potentiële ziekteverwekkers huizen die enorme economische verliezen kunnen veroorzaken. Een precieze en tijdige identificatie van dit soort ziekteverwekkers en een vaststelling van de dichtheid waarin ze voorkomen liggen aan de basis van duurzame gewasbeschermingsmaatregelen. Een kwantificering van de ziekteverwekkers is met name van belang om uiteindelijk in staat te kunnen zijn om schade- en actiedrempels vast te stellen. Tot voor kort gebeurde zulk een

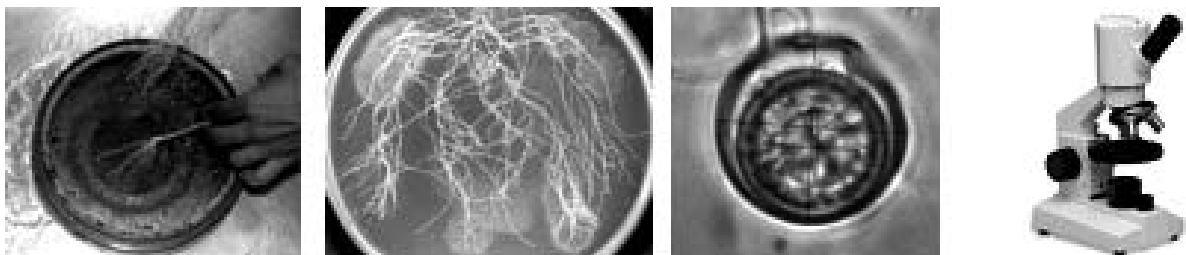
diagnose meestal op basis van de uiterlijke kenmerken van aangetaste planten of na opzuivering en morfologische identificatie van de ziekteverwekkers (Figuur 1). De specifieke tekortkomingen van deze klassieke kweek- en morfologie-gebaseerde identificatiemethoden hebben geleid tot de vraag naar, en ontwikkeling

van, moleculaire benaderingen die geen kweek van de te identificeren micro-organismen vereisen. Hoewel de meeste van deze benaderingen wel efficiënt zijn om één welbepaalde ziekteverwekker op te sporen, voldoen ze doorgaans niet wanneer men meerdere ziekte-

verwekkers tegelijk wil detecteren. De belangrijkste uitdaging voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift was dan ook een multiplex test te ontwikkelen die geschikt is voor het gelijktijdig opsporen en kwantificeren van een breed scala aan plantenpathogenen.

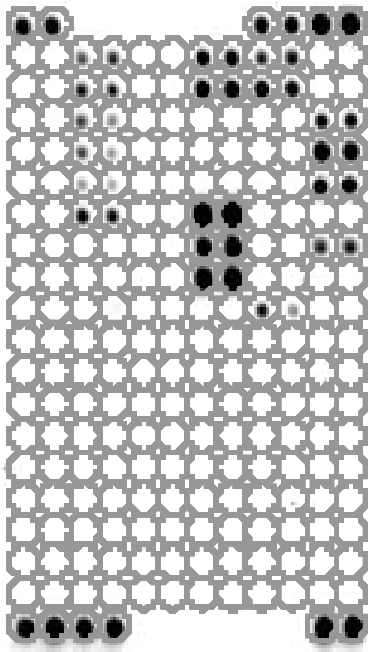
## DNA 'macro-array'

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van een DNA 'macro-array', in essentie een rooster van specifieke membraangebonden DNA fragmenten (ook detectoren of detector-oligonucleotiden genoemd), beschreven die aan bovengenoemde vereisten voldoet. Met deze technologie worden door middel van PCR gemerkte DNA amplicons verkregen van het te onderzoeken monster. Deze worden vervolgens in contact gebracht met de DNA 'macro-array', en na aflezing van de resultaten kun-



Figuur 1. Klassieke diagnose van de veroorzakers van plantenziekten: arbeidsintensief, tijdrovend en vereist taxonomische kennis.

PROMOTIES

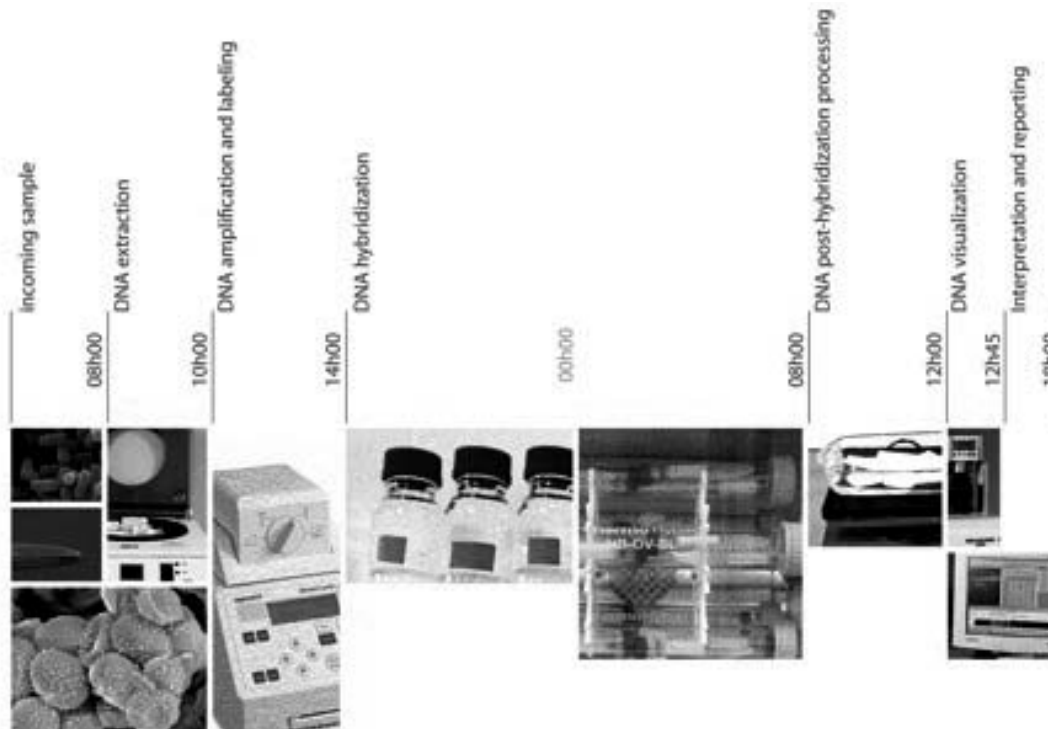


nen de ziekteverwekkers snel en efficiënt geïdentificeerd worden (Figuur 2). In eerste instantie werden in dit onderzoek de algemene voorwaarden bepaald voor het ontwikkelen van selectieve detector-oligonucleotiden. De bruikbaarheid van DNA 'macro-arrays' om 'single nucleotide polymorphisms' te detecteren werd aangetoond

Figuur 2. Voorbeeld van een DNA 'macro-array' voor snelle detectie, identificatie en kwantificatie van meerdere ziekteverwekkers. Elke positie bevat een 'detector' (in duplo) voor een bepaalde ziekteverwekker. Een positieve detectie wordt weergegeven door een zwart signaal. Op basis van de intensiteit van het signaal wordt de mate van besmetting bepaald.

door specifieke criteria in acht te nemen, zoals de positie van het enkele polymorfisme ('mismatch'), de sequentie van het oligonucleotide en de lengte en hoeveelheid van de gemerkte amplicons. Op basis van deze criteria werd vervolgens een prototype test ontwikkeld voor een aantal economisch belangrijke schimmels die tomaat kunnen aantasten, te weten *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Verticillium albo-atrum* en *V. dahliae*. Precieze identificatie van de ziekteverwekkers met behulp van de DNA 'macro-array' kan voltooid worden binnen 36 uur, in tegenstelling tot enkele dagen tot een paar weken voor de traditioneel beoefende methoden

(Figuur 3). Verder is de test op dusdanige manier ontwikkeld dat ook de dichtheid waarin de ziekteverwekkers voorkomen bepaald kan worden. Een sterke correlatie werd vastgesteld tussen de hybridisatiesignalen op de DNA 'macro-array' en de pathoogconcentraties, zowel voor standaard DNA (al dan niet in aanwezigheid van niet-doelwit DNA) als voor besmette monsters. Wanneer specifieke criteria in acht werden genomen, zoals de hoeveelheid gebonden oligonucleotiden en bepaalde controles voor het amplificatieproces, kon een accurate kwantificatie bewerkstelligd worden voor praktijkrelevante pathoogconcentraties. Kwantificatie op basis van kweekmethoden wordt algemeen als relatief onnauwkeurig of zelfs onbetrouwbaar beschouwd. Daarom werd in dit onderzoek real-time PCR, een gevestigde techniek om DNA te kwantificeren, als referentietechniek gebruikt ter validatie van de kwantificering met behulp van de DNA 'array'. De observatie dat de resultaten van



Figuur 3. Routinematige detectie van plantenziekten met behulp van DNA 'macro-arrays': snel, precies en betrouwbaar

beide kwantificatiemethoden sterk gecorreleerd waren illustreert de betrouwbaarheid en robuustheid van het kwantitatieve karakter van DNA 'macro-arrays'. In het kader van een geïntegreerde gewasbeschermingstrategie werd tenslotte een kwantitatieve DNA 'macro-array' ontwikkeld om simultaan zowel pathogenen als antagonisten (*Trichoderma*) te detecteren, alsook om hun interacties te bestuderen en hun aanwezigheid te koppelen aan ziekteontwikkeling en symptomexpressie.

Op basis van het in dit werk ontwikkelde prototype is recent een commerciële DNA 'macro-array' ontwikkeld. In zijn huidige vorm kan de test in één keer meer dan 50 verschillende ziekteverwekkers (bacteriën, schimmels en oömyceten) die voor kunnen komen in ver-

schillende tuinbouwgewassen opsporen ([www.DNAmultiscan.com](http://www.DNAmultiscan.com)). Een team van onderzoekers is de test momenteel nog verder aan het uitbreiden zodat nóg meer en ook andere typen ziekteverwekkers, waaronder ook nematoden en virussen, opgespoord zullen kunnen worden. Uiteindelijk zal dit leiden tot gewasspecifieke diagnosekits waarmee alle relevante ziekten van een bepaald gewas met behulp van één test opgespoord kunnen worden en tegelijkertijd ook de concentratie van de ziekteverwekkers bepaald kan worden.

## **Conclusies en vooruitblik**

Uit dit promotieonderzoek, uitgevoerd aan het Scientia Terrae Research Instituut in samen-

werking met de Katholieke Universiteit Leuven en de Wageningen Universiteit, kan geconcludeerd worden dat DNA 'macro-arrays' met succes kunnen worden gebruikt voor het gelijktijdig detecteren en kwantificeren van verschillende plantenpathogenen in biologisch complexe monsters. Naast zijn toepassingsmogelijkheden voor het routinematig detecteren van plantenpathogenen, heeft deze techniek bovendien het potentieel om een essentieel onderdeel te worden in een nieuw gewasbeschermingsbeleid alsook om ingezet te worden in diverse ecologische en epidemiologische studies.