

Ontwikkeling basisprincipes die nodig zijn voor multiplex-detectiesystemen, resulterend in een bodemgezondheidschip

P-42

Peter Bonants¹, Marianna Szemes, Arjen Speksnijder¹, Carolien Zijlstra¹, Jos Wubben², Joop van Doorn³ en Cor Schoen¹.

¹ Plant Research International, Wageningen

² Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Glastuinbouw, Aalsmeer

³ Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Bollen en Bomen, Lisse

Het doel van het project (onderdeel van DWK programma 397III) is om basisprincipes te ontwikkelen die nodig zijn voor multiplex detectiesystemen, resulterend in een bodemgezondheidschip. Hiertoe worden **DNA extractieprotocollen** voor grond ontwikkeld, alsmede een **multiplex amplificatiesysteem** voor meerdere targets. Targets kunnen zijn schadelijke plantpathogenen, goedaardige organismen (beneficials), maar ook genen die betrokken zijn bij bodemgezondheid. Het zoeken naar nieuwe genen, die coderen voor antibiotica productie of antagonistische mechanismen, speelt hierbij een belangrijke rol (**Metagenoom**) en vormt een belangrijk potentieel verband met de gezondheid van de bodem en daarvoor de bodemgezondheidschip.

De hypothese is dat genen die hierbij betrokken zijn zich bevinden in micro-organismen in de bodem. Van deze micro-organismen kunnen we het merendeel (95%) niet volgens conventionele kweekmethoden bestuderen. Het gebruik van recent ontwikkelde moleculair biologische technieken moet toegang geven tot deze genenpoel in de grond. Deze sequenties geven een belangrijk potentieel verband met de gezondheid van de bodem. Het onderzoek naar dit soort genen is van belang voor de conceptontwikkeling van een bodemgezondheidschip. Om de relatie van bodemweerbaarheid en microbiële populaties te identificeren vinden microbiële analyses plaats van bodems die wendend zijn tegen microbiële plantpathogenen.

Om de relatie van bodemweerbaarheid en microbiële populaties te identificeren vinden microbiële analyses (**DGGE**) plaats van bodems die wendend zijn tegen microbiële plantpathogenen om zo relevante targets (bv antagonisten) te identificeren.

De targets voor plantpathogenen worden in overleg met o.a. PPO, PD en keurings-laboratoria vastgesteld.

Werkwijze

- Ontwikkeling van extractietechnieken van DNA uit grond. Doel is om het DNA van de in de grond aanwezige structuren (oosporen, cellen, (micro)sclerotien, cysten, juvenielen, etc.) van organismen (schimmels, bacterien, aaltjes, etc.) op zodanige wijze te isoleren dat het de verhouding, waarin de organismen in de grond voorkomen, weerspiegelt.
- Ontwikkeling DGGE bodemprofiel fingerprint als eerste monitoring van grondkwaliteit.
- Ontwikkeling van een multiplex detectie en monitoringsysteem van relevante organismen (pathogeen/beneficial) m.b.v. DNA micro-arrays.
- Isolatie van hoog molecuulair bacterieel DNA uit ziekteverwekkende gronden. Dit DNA wordt gekloneerd in artificiële bacteriële chromosomen. De bacteriële genen uit de bodem worden tot expressie gebracht in *E.coli*. Deze genenbank wordt dan gescreend op anti-microbiële activiteit. *E.coli* klonen met anti-microbiële activiteit bevatten genen die betrokken zijn bij de bodemweerbaarheid. Deze genen kunnen verder gekarakteriseerd worden. Kennis over deze genen helpt ons bij het ontwerpen van de bodemgezondheidschip op het functionele niveau.
- Ontwikkeling van een bodem DNA-chip waarop de expressie van genen wordt gemeten die een functie hebben in bodemgezondheid om daarmee een uitspraak te kunnen doen over de mate van weerbaarheid (of de afwezigheid daarvan) in een bepaalde bodem.

Resultaten

Er zijn diverse DNA extractiemethodieken met elkaar vergeleken.

DGGE fingerprintpatronen zijn gemaakt voor schimmel- en bacteriepopulatie van deze extracten. Een multiplex amplificatiesysteem is ontwikkeld voor een elftal targets.

Hoog molecuulair bacterieel DNA isolaties vanuit grond zijn uitgevoerd om Bac-banken te maken met grote inserts.

De bank is gescreend voor een aantal interessante genen

Slotconclusie

Momenteel is een aantal basisprincipes uitgetest en gereed om te worden toegepast op verschillende gronden. In 2005 worden derhalve verschillende gronden multiplex geanalyseerd op de aanwezigheid van een aantal geselecteerde organismen.

POSTER