

DNA-technieken voor de

Bij het gebruik van DNA-technieken bij planten denken de meeste mensen meteen aan genetische modificatie. Deze speelt bij boomkwekerijgewassen echter nog niet of nauwelijks een rol. Maar er bestaan wel degelijk bruikbare en betaalbare DNA-technieken voor deze branche. Het gaat dan niet om het veranderen van eigenschappen van planten, maar alleen om het meten ervan, bijvoorbeeld voor identificatie van planten en ter ondersteuning van klassieke kruisingsveredeling. Dit type DNA-technieken is bekend uit politieseries als CSI, of van nieuwsberichten over het opsporen van biologische vaders. Maar wat kunnen ze betekenen voor boomkwekerijgewassen?

IR. M.E.C.M. HOP, ONDERZOEKER SELECTIE EN GEBRUIKS-
WAARDE BOOMKWEKERIJGEWASSEN BIJ PRAKTIJKONDER-
ZOEK PLANT EN OMGEVING, LISSE

Dit artikel is een bewerking van het artikel 'DNA-technieken voor de boomkwekerij' van de hand van ir. M.E.C.M. Hop, dat eerder verscheen in Dendroflora 45 (2008) p. 19-25.



boomkwekerij

DNA

Om die vraag te kunnen beantwoorden, moet er eerst iets meer worden verteld over DNA. Dit is een zeer lang molecuul, dat in de kern van elke cel van een plant zit. Het ziet eruit als een gedraaide touwladder. De sporten van de ladder bestaan uit tweetallen 'basen', kleine chemische stoffen die in vier varianten kunnen voorkomen, aangeduid met C, G, A en T. Eén sport bestaat uit de combinatie C en G, of A en T. Bij bijvoorbeeld de populier telt de DNA-ladder in één cel circa 550.000.000 sporten, en is het totale DNA per cel – als het achter elkaar gelegd zou worden – 17,8 cm lang. Maar omdat het DNA heel dun en netjes opgerold is, past het in de celkern. Het ligt ook niet als één lange keten in de celkern, maar is in meerdere stukken verdeeld, de chromosomen.

Samen met de omgeving bepaalt het DNA hoe de plant eruitziet en functioneert. Een groot deel van het DNA lijkt geen functie te hebben, maar enkele procenten maken deel uit van genen. Een gen is een stuk DNA dat wel een functie heeft in de plant. De volgorde waarin de basen in het DNA zitten, bepaalt welke eiwitten in de cel gemaakt kunnen worden. Eiwitten kunnen allerlei functies hebben, maar een van de belangrijkste is die van enzym. Enzymen zijn katalysatoren, die alle chemische reacties waartoe een cel in staat is aansturen. Maar elke cel heeft een eigen speciale taak in de plant, waarvoor hij niet al die enzymen steeds nodig heeft. Genen kunnen daarom ook in- en uitgeschakeld worden, waardoor bijvoorbeeld de kleurstof in de bloem niet ook in de bladeren en wortels gemaakt wordt. En de volgorde van aan- en uitzetten van genen regelt onder meer hoe een zaadje zich tot bloeiende plant ontwikkelt.

Soortechtheid als kwaliteitskenmerk

Voor handelsdoeleinden is het belangrijk dat klanten precies de plant geleverd krijgen die ze besteld

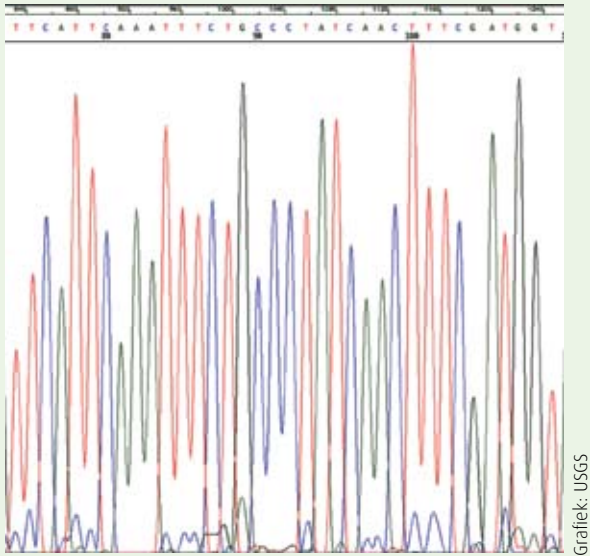
hebben; soortechtheid is daarom een belangrijk kwaliteitskenmerk. Ook voor kwekersrechtelijke bescherming is correcte identificatie onmisbaar. Boomkwekerijgewassen kunnen geïdentificeerd worden aan de hand van hun uiterlijke kenmerken. Van veel gekweekte soorten is een botanische beschrijving beschikbaar in taxonomische literatuur, en ook onbekende planten kunnen daarmee meestal wel gedetermineerd worden. Bij cultivars is dat wat lastiger, omdat de beschrijving soms nergens op papier is gezet. Bovendien verschillen cultivars vaak maar op één of enkele uiterlijke eigenschappen van de botanische soort. Vaak wordt volstaan met een beschrijving als 'compact en witbloeiend', maar dat levert een probleem op als er later meerdere compacte witbloeiende cultivars in de handel komen. Want waarin verschillen die van elkaar?

Als een afwijkende eigenschap bijna altijd zichtbaar is, vergemakkelijkt dit de identificatie van een bepaalde cultivar. Het wordt lastig als deze afwijkende eigenschap maar gedurende een korte tijd van het jaar zichtbaar is, als deze alleen aan volwassen planten af te zien is, of als deze sterk beïnvloed wordt door de groeiomstandigheden. In zo'n geval zou je kunnen kijken naar het DNA van de plant. DNA is in alle plantendelen aanwezig, het vertoont variatie tussen cultivars en de basevolgorde wordt niet door de omgeving beïnvloed. Omdat de meeste cultivars van boomkwekerijgewassen klonen zijn, zouden alle exemplaren van een cultivar identiek DNA moeten hebben. Twee verschillende cultivars van dezelfde soort zullen voor een heel groot deel dezelfde volgorde van basen hebben op hun DNA. Maar soms zijn er net een paar basen anders, wat er bijvoorbeeld voor zorgt dat het ene ras witte bloemen heeft, en het andere blauwe. Maar er zijn nog vaker kleine verschillen in basen in stukken DNA die niets lijken te doen, of in elk geval niet iets dat aan de

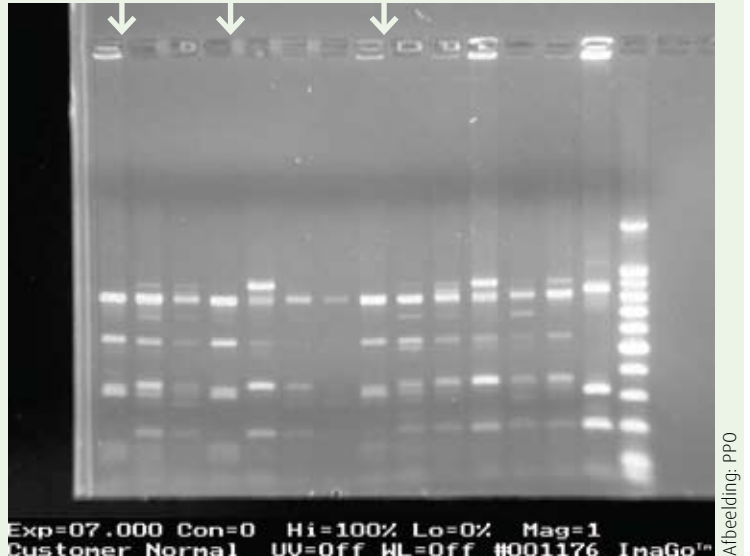
DNA-molecuul



Herkenning in het veld blijft nodig



Afbeelding 2 Dit is het soort grafiek dat uit het apparaat komt dat de DNA-volgorde afleest (een sequencer). Bovenaan staat de gevonden basenvolgorde.



Afbeelding 3 Een DNA-streepjescode. Bovenaan zijn de gaatjes te zien waarin de monsters gedaan zijn. In de rechterbaan is een mengsel van stukjes DNA met een bekende lengte gedaan, dat als een meetlat wordt gebruikt. Links zijn naast elkaar 14 streepjescodes te zien. Bijvoorbeeld monsters 1, 4 en 8 lijken identiek.

buitenkant van de plant waarneembaar is. Al deze verschillen in basen noemt men 'polymorfismen', en die zijn met DNA-onderzoek op te sporen.

DNA aflezen

Om verschillen te vinden zou je alle letters van het DNA kunnen aflezen. Dat is wat men voor de mens heeft gedaan in het Human Genome Project. Ook voor de dieren en planten die voor de mens het belangrijkst zijn, is inmiddels het hele DNA afgelezen, of wordt daar druk aan gewerkt. Het modelplantje *Arabidopsis thaliana* (zandraket), dat veel gebruikt wordt in genetisch onderzoek aan planten, was de eerste plant in 2000. Maar ook van rijst en sojaboon kennen we inmiddels grotendeels het DNA. Sinds 2006 is ook de eerste DNA-volgorde van een boom bekend: de populier. Van veel planten heeft men al een flink stuk gedaan, zoals van tomaat, aardappel, banaan, tarwe en maïs. Maar het is nog steeds een behoorlijk tijdrovende en kostbare techniek. Het aflezen van het hele DNA is vooral interessant om de werking van genen te onderzoeken en de evolutionaire verbanden tussen planten te achterhalen. Voor veel onderzoeksvragen hoeven we echter niet het hele DNA te kennen. Bij identificatie wil je vooral weten of twee individuen gelijk of verschillend zijn in hun DNA; daarvoor volstaat het aflezen van een deel van het DNA. En soms willen we alleen een specifiek stukje DNA aflezen, bijvoorbeeld een stukje dat bepaalt of een plant resistent is of niet.

Streepjescode

Voor het vergelijken van een deel van het DNA bestaan veel verschillende technieken, die sneller en goedkoper zijn dan het aflezen van het hele DNA. Ze leveren meestal een plaatje op dat bandenpatroon, streepjescode of fingerprint wordt genoemd. Twee veelgebruikte technieken zijn AFLP en RAPD (zie afbeelding 3).

Voor deze technieken wordt niet het hele DNA bekeken, maar wordt er een steekproef uit genomen. Het maken van deze bandenpatronen is een snelle techniek – het duurt uren tot enkele dagen – maar kost wel minimaal enkele honderden euro's.

Bovendien zijn er voor elke plantensoort kleine variaties in de techniek nodig, die eerst moeten worden uitgezocht. Daarom wordt de techniek vooral gebruikt voor grote gewassen, of wanneer er grote financiële belangen gemoeid zijn met een identificatie. Voor steeds meer planten is het uitzoekwerk om de beste techniek te bepalen inmiddels al eens gedaan, en dus wordt de drempel om dit onderzoek toe te passen steeds lager. Als het eenmaal routinewerk wordt, dan hoeft het niet veel meer dan 1 euro per monster te kosten.

Het maken van een streepjescode begint met het nemen van een monster van de plant, meestal wat blad of een stengeltopje. Dit wordt gemalen, waarna het DNA met een oplosmiddel uit het maatsel wordt gehaald. Vervolgens wordt het DNA in stukjes geknipt met een enzym dat alleen knipt op plaatsen waar het een vaste volgorde van basen

De drempel voor DNA-onderzoek wordt steeds lager

Enkele technieken

RFLP (Restrictiefragment-lengtepolymorfisme)

De oudste techniek. Hierbij wordt een flinke hoeveelheid DNA geknipt en meteen op een gel gescheiden, zonder het te kopiëren. Daarna wordt met een radioactief herkenmolecuul een deel van de streepjes op de gel zichtbaar gemaakt.

PCR (Polymerasekettingreactie)

De techniek waarmee stukjes DNA worden gekopieerd.

RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

Hierbij wordt het DNA geknipt en selectief vermeerderd. De knipenzymen zijn zo gekozen dat ze bij alle organismen wel bandjespatronen geven, ook als er weinig over het organisme bekend is. Een relatief goedkope techniek, maar niet altijd goed herhaalbaar.

AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Ook dit is een combinatie van knippen en selectief vermeerderen, maar in meerdere goed controleerbare stappen. Deze techniek is wat duurder, maar heel goed herhaalbaar en levert per test veel bandjes in het bandenpatroon op.

SSR (Simple sequence repeats)

Deze techniek kijkt naar stukjes DNA waarbij hetzelfde patroontje van twee of drie basen zich vele malen herhaalt. Dit zijn delen van het DNA waarin bij uitstek veel verschillen tussen individuen te vinden zijn. Deze techniek kan ook heel goed het onderscheid maken tussen een hogere plant en eventueel aanwezige ziekteverwekkers.

op het DNA aantreft. Zo'n knipenzym, bijvoorbeeld het veelgebruikte EcoR1, zoekt bijvoorbeeld naar de volgorde GAATTC. De geknipte stukjes DNA worden vervolgens exact gekopieerd met de PCR-techniek. Tijdens het kopieerproces voegt men primers (ook een soort enzymen) toe, die ervoor zorgen dat slechts een selectie van de DNA-fragmenten wordt vermeerderd, zodat er uiteindelijk een beperkt en goed hanteerbaar aantal streepjes zal ontstaan.

Het mengsel van stukjes DNA wordt gescheiden op basis van hun grootte en elektrische lading op een zogenaamde elektroforesegel. Dit ziet eruit als een dunne plak gelatinepudding, die in een bak met vloeistof wordt gelegd waar aan de boven- en onderrand een stroomdraad in steekt. Door de stroom bewegen de stukjes DNA van de rand van de gel naar de overkant, maar de stroom wordt uitgezet als ze ergens midden in de gel zijn. Op plaatsen waar veel identieke stukjes terecht komen, wordt dan na toevoeging van een kleurstof een streepje zichtbaar in het bandenpatroon.

Als de ene cultivar wel exact de juiste basenvolgorde heeft waarbij het enzym knipt, dan ontstaan er twee DNA-fragmenten. Als bij een vergelijkbaar ras op die plaats net één base anders is, dan knipt het enzym niet, en ontstaat er één lang DNA-fragment in plaats van twee korte. Dat verschil wordt zichtbaar in de streepjescode.

Wie deze uitleg wat te abstract is, kan eens kijken op de website <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>. Hier wordt met een tekenfilmpje precies uitgelegd hoe van een monstertje DNA een streepjescode wordt gemaakt.

Mogelijkheden en beperkingen

Uit dit systeem is af te leiden, dat het enige deel van het DNA dat ertoe doet in deze tests, het

stukje is waar het knipenzym of de primer op aangrijpt. Dat is maar een fractie van de totale hoeveelheid DNA, dus er zullen ook veel verschillen tussen cultivars gemist worden. Cultivars die veel van elkaar verschillen, bijvoorbeeld omdat het zaailingen uit verschillende kruisingen zijn, kunnen goed worden opgespoord. Een klein verschil, zoals tussen een cultivar en een sport daaruit, is met deze techniek juist heel moeilijk te vinden. Een plaatje van een streepjescode zegt op zich nog niet zoveel. Het is namelijk maar zelden bekend welk streepje correspondeert met welke eigenschap in de plant. Maar wanneer zowel onbekende als bekende planten tegelijk worden getest, is wel goed te zien welke identiek lijken en welke verschillend zijn. Twee planten met een verschillende streepjescode kunnen niet identiek zijn. Twee planten met een gelijke streepjescode behoren meestal tot dezelfde kloon. Dat is echter niet 100% zeker, omdat een klein verschil gemist kan zijn door de techniek. Ze zijn echter wel nauw aan elkaar verwant.

Deze techniek is een krachtig hulpmiddel voor taxonomen. Het identificeren van planten en het ontrafelen van de verwantschappen ertussen, wordt er een stuk gemakkelijker door. Het is hiervoor wel nodig dat er goed geïdentificeerd referentiemateriaal aanwezig is, in de vorm van levende planten of ingevroren plantmateriaal. Het zal in de toekomst ook mogelijk worden om alleen de streepjescodes van referentiemateriaal te bewaren in een database, en die te vergelijken. Op dit moment worden nog veel DNA-technieken door elkaar gebruikt, en ook het aantal knipenzymen en primers (die elk een verschillend bandenpatroon opleveren) is enorm. Voor elke plant zouden dan zeer veel streepjescodes moeten worden bewaard, maar zo'n database is er nu nog niet. Er wordt



Van 't vat

JITZE KOPINGA

Wat is het beste moment om bolesdoorns te knotten, en waarom?

Een bolesdoorn is een boomsoort die bloedt vanuit de zaagvlakken wanneer hij in de winterperiode wordt gesnoeid. Alhoewel een boom er bij normale snoei zelden door zal doodbloeden, kan dit bij bomen die worden geknot de nekslag zijn. Het bloeden komt door de 'overdruk' van vocht in de houtvaten dat in de rustperiode van de boom door de wortels is opgenomen en nog niet via het blad kan verdampen. De boom kan daarom beter worden geknot in het vroege groeiseizoen, wanneer het uitlopende blad de stam al wat heeft 'drooggetrokken', de wortels al door de uitlopende knoppen van de benodigde groeihormonen zijn voorzien, de druk van de wortels inmiddels is verminderd en de boom nog volop nieuwe takscheuten kan vormen. Maar waarom zou je een bolesdoorn eigenlijk moeten knotten? Hij is niet bedoeld om als knotboom onderhouden te worden. En wanneer het kroonvolume te groot is geworden, dan verdient het innemen van de kroon of een gefaseerde en begeleidende snoei (gericht op de ontwikkeling van nieuwe loten, dieper in de kroon) de voorkeur boven knotten. De achtergronden hiervan zijn dat door de aanwezigheid van wat 'spaatelgen' de hormonen- en koolhydratenhuishouding niet te veel wordt verstoord en de boom daardoor minder verzwakt, en dat zodoende een eventuele aantasting door het meniezwammetje of door andere gelegenheidsparasieten minder nadelig zal uitpakken.

Boombioloog Jitze Kopinga van Alterra, Wageningen UR, geeft in elk nummer van Bomen antwoord op een boombiologische vraag. Heb je een vraag? Of wil je reageren op het antwoord van Jitze? Mail je vraag of reactie dan aan de redactie: vakblad@kpb-isa.nl

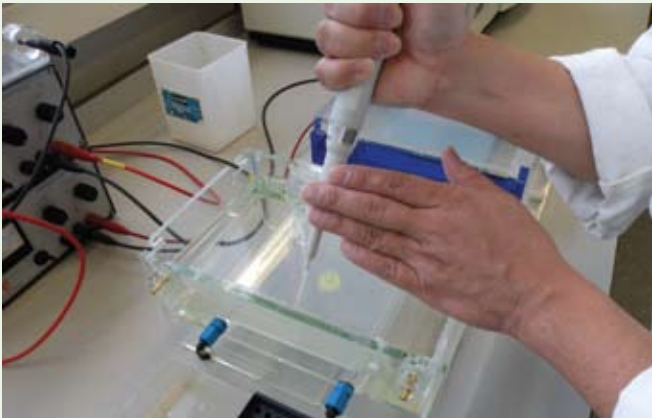


Foto: PPO

Monstertjes DNA worden met een pipet in de gaatjes van een gel gespoten. De gel ligt onder water in de glazen elektroforesebak.

wel gewerkt aan dit type database, maar dan voor quarantaineorganismen. De douane wil die database gaan gebruiken om snel verdachte partijen planten te kunnen onderzoeken op bijvoorbeeld virussen, schimmels of plagen.

DNA niet alleenzaligmakend

DNA-technieken maken het vergelijken van uiterlijke kenmerken echter niet overbodig voor identificaties. Niet iedereen heeft immers de beschikking over een DNA-laboratorium, dus herkenning in het veld blijft nodig. Bovendien levert een uiterlijke beschrijving ook andere kenmerken op dan een DNA-test, vooral omdat er per uiterlijk kenmerk meerdere antwoorden mogelijk zijn, zoals: bladkleur is groen, blauwgroen, geel, rood of groen met witte rand. Streepjes in een DNA-code zijn altijd alleen aanwezig of afwezig. Ook voor het vergelijken van huidige planten met fossielen is men aangewezen op uiterlijke kenmerken. Van fossielen heeft men immers het DNA niet, omdat dit veel sneller vergaat dan stevige delen van de plant, zoals celwanden.

Op www.kpb-isa.nl staat een uitgebreide versie van dit artikel, waarin nader wordt ingegaan op de toepassingen van DNA-technieken en op vragen uit de praktijk.

Bronnen

Cursusdictaat 'Veredeling m.b.v. moleculaire merkers en bio-informatica', *Breedwise*, 2005.
Verder is informatie gebruikt uit verschillende lezingen over DNA-technieken, merkergeassisteerde veredeling en kwekersrecht door experts.
www.vilt.be/Ceysens_plant_eerste_genetisch_gemodificeerde_populier
www.pri.wur.nl/NL/nieuwsagenda/nieuws/qbol070509.htm
www.jgi.doe.gov/sequencing/why/whitepaper.populus.html