

Genoom analyse van ziektewerende bodems

Arjen Speksnijder en Leo van Overbeek

In de bodem is het grootste deel van de micro-organismen (90-99%) niet bekend. Een belangrijke reden hiervoor is dat de meeste micro-organismen zich niet laten opkweken vanuit hun natuurlijke leefomgeving. Tal van processen in de bodem worden bepaald door micro-organismen. Bijvoorbeeld voor de stikstofhuishouding is microbiële nitrificatie een belangrijk proces, ook kunnen vervuilde bodems zich herstellen via bioremediatie waarin ook micro-organismen een grote rol spelen.

Micro-organismen kunnen een stimulerende werking hebben op plant en dier en zelfs een beschermende functie uitoefenen. Opportunistische belagers van buitenaf kunnen worden afgeweerd door competitie en antibiotica productie.

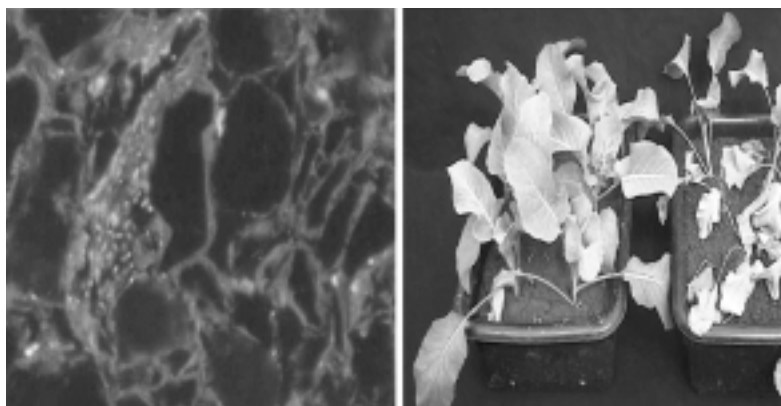
scherming (J. Postma, dit nummer).

Populatie monitoren

Om deze microbiële populaties te kunnen volgen in de bodem zonder daar langdurige kweekprocessen en specialistische determinatie onder de microscoop uit te voeren worden er DNA analyse technieken toegepast welke ons in

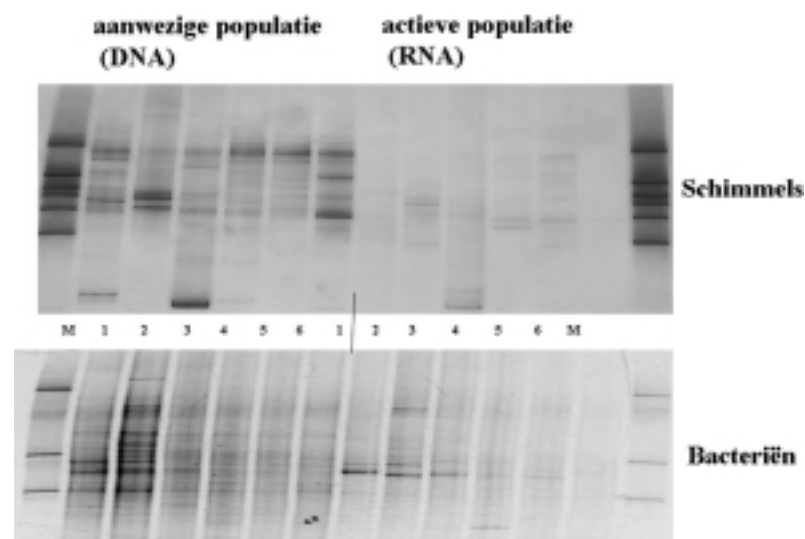
Ziektewering

Recent onderzoek heeft aangetoond dat de productie van antibiotica en andere metabolieten door de aanwezige microflora in de bodem een bijdrage kunnen leveren aan de wering van ziekten en plagen. Deze zogenaamde antagonistische micro-organismen kunnen plant (en dier) beschermen tegen ziekteverwekkers. Karakterisatie van antagonisten en hun functies zijn belangrijk voor bepaling van de intrinsieke weerbaarheid in de bodem en kan leiden tot brede toepassingen binnen de gewasbe-

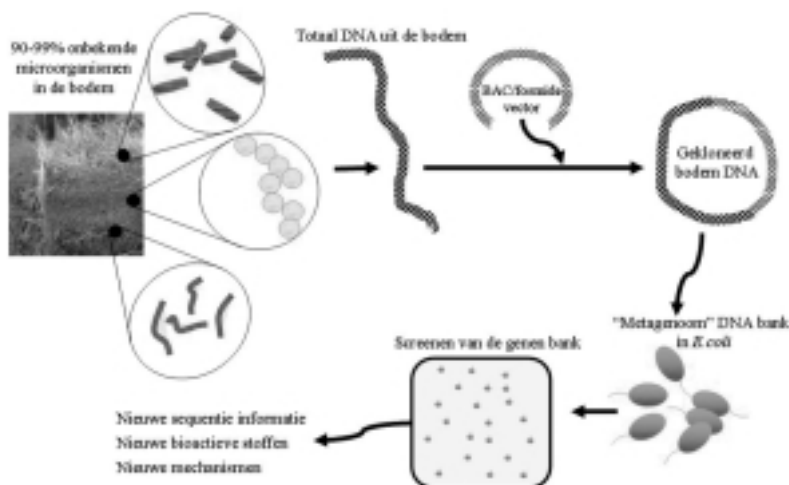


Figuur 1. Weergave van bacteriën in de bodem. In deze grond zijn de bacteriën aangekleurd met een fluorescerende stof. Veel van deze bacteriën kunnen niet gekweekt worden.

Figuur 2. DNA vingerafdrukken waarbij een verschil in bacterie en schimmel samenstelling aange- toond wordt tussen zes verschillende bodemmonsters. Het verschil in bandposities van vingerafdrukken laat zien dat er verschillende schimmel en bacteriepopulaties aanwezig zijn in de verschillende grondmonsters. Daarnaast tonen de RNA vingerafdrukken een ander bandenpatroon dan de DNA vingerafdrukken. Dit is een indicatie dat de actieve microbiële populaties verschillen van de dominant aanwezige populaties.



[ARTIKEL



Figuur 3. Schematische weergave voor de constructie van een genenbank uit bodem DNA.

Onbekende antibiotica

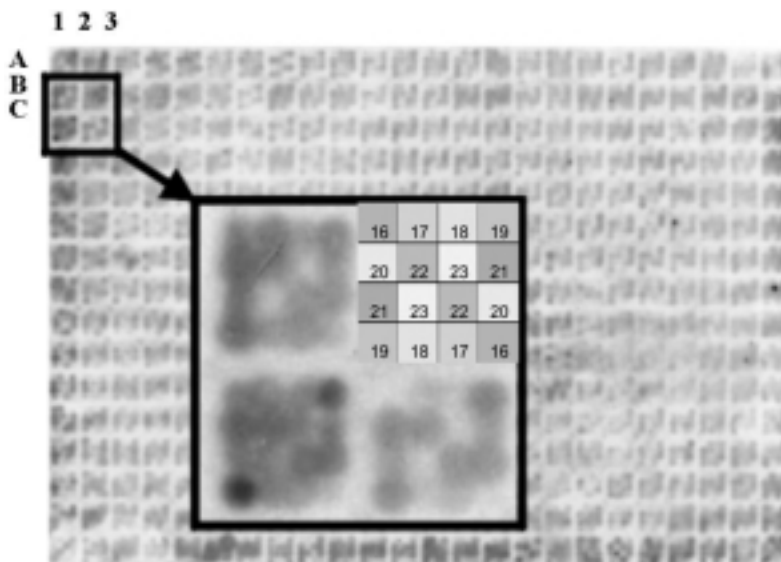
plantpathogenen. Hiervoor is een verbeterde extractie methode ontwikkeld waarin microbiële cellen van gronddeeltjes worden gescheiden en geïsoleerd. Van deze celfractie wordt het totaal DNA geëxtraheerd en een genenbank geconstrueerd. Deze genenbank bevat bij lange na niet alle genen die in de bodem aanwezig zijn maar naar verwachting zullen de meest dominante genen hierin vertegenwoordigd zijn.

De genenbank van de bodem is onderzocht op biologische activiteit met behulp van DNA probing gericht op genen die betrokken zijn bij antibiotica productie. Resultaten duiden op aanwezigheid van tot nu toe onbekende antibiotica genen in de bodem. Nieuwe DNA testen om deze tot nu toe onbekende antibiotica genen in de bodem te kwantificeren moeten tot een relatie leiden waarin deze antibiotica productie gekoppeld is

ARTIKEL

staat stellen de schimmel en bacterie samenstelling te kunnen volgen. Op basis van het ribosomale gen, wat in ieder organisme aanwezig is maar wel verschillend is tussen organismen, kunnen we bepalen wat de diversiteit is van de micro-organismen en ze ook determineren op soortsniveau. Deze ribosomale genen kunnen door middel van PCR amplificatietechniek uit bodem vermenigvuldigd worden. De diversiteit kan bepaald worden door het DNA van deze ribosomale genen te kloneren en daarna de DNA base volgorde te bepalen. Ook kan het als geheel geanalyseerd worden door een DNA vingerafdruk te maken op een speciale acryl gel (DGGE) waarbij ieder bandje in het bandenpatroon een bepaalde soort micro-organisme vertegenwoordigt. Van deze banden kan ook de DNA sequentie volgorde bepaald worden. Naast DNA afdrukken kunnen ook RNA vingerafdrukken gemaakt worden om de meest actieve soorten weer te geven.

ken naar de aanwezigheid van genen die direct verantwoordelijk zijn voor bepaalde processen. De aan- of afwezigheid van genen die betrokken zijn bij bepaalde processen kunnen een indicatie zijn voor de activiteit van een bepaald proces in de bodem. Om de relatie van bodemweerbaarheid met de productie van antibiotica door bacteriepopulaties te identificeren, vinden analyses plaats in gronden die werend zijn tegen



Figuur 4. 6144 spots zijn in een autoradiogram weergegeven welke grote stukken DNA van 50kB vertegenwoordigen waarop meerdere genen liggen. Duizenden spots zijn geanalyseerd met probes gericht op antibiotica productie. Donkere spots (in duplo) duiden op potentiële antibiotica productie genen (bijvoorbeeld positie negentien in blok C1). DNA sequentie informatie kan bepaald worden van de spots. Op basis hiervan kunnen nieuwe DNA testen ontwikkeld worden.

Genenbank van werende bodems

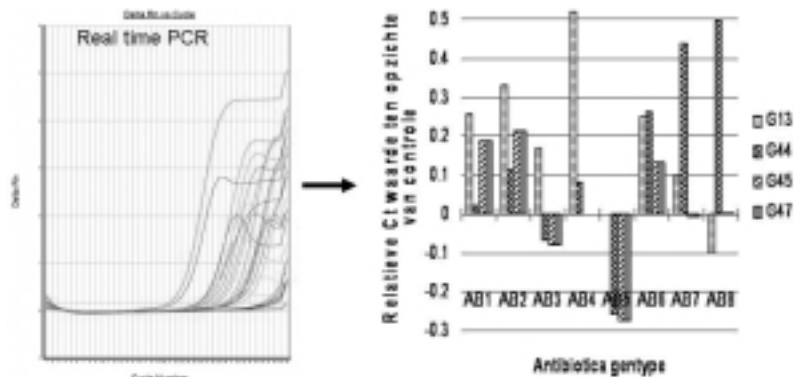
Naast het onderzoek naar de aanwezigheid en diversiteit van micro-organismen wordt ook geke-

aan ziektevering. Daarnaast wordt de mogelijkheid onderzocht of deze nieuw verworven antibiotica sequenties een medische toepassing kunnen hebben.

Detectie van weerbaarheid

DNA testen voor de detectie van nieuwe antibiotica zijn ontwikkeld op basis van "Real-Time" analyse. De techniek stelt ons in staat om hoeveelheden DNA te bepalen van specifieke genen. Hieruit moet een relatie volgen waarbij een toename van antibiotica producerende genen duidt op een toename van de bodemweerbaarheid tegen rhizoctonia.

Detectie van antibiotica genen kan potentieel toegepast worden op elk biologisch uitgangsmateriaal waar kwaliteitsbeoordeling en ziektevering van belang is, zoals



Figuur 5. Real time analyse van acht genen op vier gronden welke verschillen in remmende werking op Rhizoctonia groei. Gen typen AB7 en AB8 geven een verhoogde waarde in grond type G44 ten opzichte van de controle. Dit is grond met een lange historie van grasland waarop maïs is aangeplant. Uit biotoetsen is gebleken dat deze grond een verhoogde suppressiviteit heeft tegen het bodempathogeen Rhizoctonia.

bij compostering en dekaarde productie. Maar ook bij de kwaliteitsbeoordeling van landbouwpercelen kan een snelle DNA analyse van de microflora een belangrijke bijdrage leveren in beslissingsmodellen voor landgebruik en bestemmingsplan. De in-

zet van (chemische) bestrijdingsmiddelen kan naar verwachting afgestemd worden aan de natuurlijk aanwezige ziektevering in bodem en plant. Dit leidt tot economische verantwoorde en maatschappelijk geaccepteerde productiewijzen.

ARTIKEL