



Slutrapport för Tillväxtfondens projekt nr: **2016/175**

Säker detektion av rotgallnematoder med LAMP-metod

Zahra Omer¹, Maria Viketoft², Ann-Charlotte Wallenhammar³ och Stina Andersson⁴

¹ Hushållningssällskapet/ HS Konsult AB, Box 412, 751 06 Uppsala

² SLU, Institutionen för ekologi, Box 7044, 750 07 Uppsala

³ Hushållningssällskapet/ HS Konsult AB, Box 271, 701 45 Örebro

⁴ HIR Skåne, Borgeby Slottsväg 11, 237 91 Bjärred



Tidiga angrepp av rotgallnematoden *Meloidogyne hapla* i morötter. Foto: Stina Andersson, HIR Skåne

2017-03-30

Sammanfattning

Rotgallnematoder av arten *Meloidogyne hapla* är allvarliga skadegörare i grönsaksodling, framförallt i morötter. Morötter måste odlas på fält som är fria från rotgallnematoder, eftersom deformerade morötter är osäljbara. Insamling av jordprover och efterföljande analys av nematoder är en viktig åtgärd för odlarna för att bedöma risken för nematodskador i fält. Den traditionella analysmetod som används (morfologisk bestämning i mikroskop) är tidskrävande och har låg kapacitet, och det finns ett stort behov av en robust analysmetod med hög kapacitet. Syftet med förstudien var att sätta upp en fungerande och tillförlitlig LAMP-metod för detektion av rotgallnematod (*M. hapla*). Först undersöktes en publicerad molekylär analysmetod, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) för detektion av rotgallnematod. DNA utvanns från andra stadiets rotgallnematodjuveniler (J2) och kunde amplifieras från samtliga testade nivåer (2-64 J2). Resultatet visualiserades enkelt genom att tillsätta en färgindikator. En undersökning av specificiteten visade dock att metoden inte var tillräckligt specifik då även DNA från rotsårsnematoder detekterades. En ny LAMP-metod utvecklades med primrar designade från en specifik gensekvens (Heat Shock Protein 90) hos rotgallnematoden. Denna nya LAMP-metod är både känslig och specifik och upp till 100 pg DNA kan detekteras motsvarande 10 pg i realtids-versionen, vilket är betydligt lägre än den mängd DNA man får från en enskild juvenil. Specificiteten av metoden testades mot rotsårs-, nål-, stubbrots- och betcystnematoder och inget DNA amplifierades från någon av dessa nematodarter. Det övergripande målet är att ge näringen, odlare och rådgivningsbranschen tillgång till en snabb och säker DNA-baserad analysmetod för att identifiera och kvantifiera antalet rotgallnematoder i jord.

1. Bakgrund

Morötter är en viktig del av den svenska trädgårdsnäringen och står för 10 % av produktionsvärdet av trädgårdsväxter (anonym a). Både produktionen och konsumtionen av morötter har ökat stadigt samtidigt som antalet producerande företag minskat. Morötter odlas intensivt på en begränsad areal, framförallt i Skåne och på Gotland, och där ökar problemen med rotgallnematoder (Andersson, 2009; Birgitta Kallings, muntligen). Andra grönsaker som potatis, lök och sallat är också kända värdväxter för rotgallnematoden, och odlas vanligen i samma växtföljd som morötter, vilket gör att rotgallnematoden ständigt uppförökas, och dessutom är de flesta vanliga ogräsarter och rödklöver också värdväxter (Andersson, 2009).

Jordprovtagning och efterföljande analys av nematoder är mycket angeläget för att kunna bedöma risken för nematodskador i ett fält samt kunna planera växtföljden för att undvika uppförökning och därmed minimera skördeförlusten. Av de 312 företag som odlar morötter, tas idag endast jordprover från ca 40 gårdar årligen. Men var och ett av dessa företag som kontrollerar förekomsten av rotgallnematoder, skickar endast in ett prov per fält vilket inte är tillräckligt. Flera jordprover bör tas per fält för att ge en bättre bild av nematodförekomsten. Vår erfarenhet av andra jordburna skadegörare, t ex *Plasmodiophora brassicae* som orsakar klumprotsjuka i höstraps, tyder på att flera jordprover måste tas per fält för att kunna få en tillräckligt bra bild av inomfältsvariationen av klumprotsjuka (Wallenhammar m fl., 2012). Förutom inomfältsvariation så kan förekomsten dessutom variera betydligt mellan olika år. I ett långliggande odlingssystemförsök i Önnestad med fokus på grönsaker konstaterades mycket höga halter av rotgallnematoder i vissa försöksrutor, men årliga nematodanalyser i försöksrutornaviserade att rotgallnematodpopulationen varierade kraftigt mellan åren (Modig, 2015).

Den konventionella detektionsmetoden för rotgallnematoder är morfologisk bestämning under mikroskop. Först måste nematoderna drivas ut ur jordproverna för att sedan identifieras och

räknas i vattenlösning under mikroskop, vilket är tidskrävande. Vid Hushållningssällskapets Nematodlaboratorium, dit odlare skickar sina prover för analys, drivs nematoderna ut från jordproverna med Seinhorsts elutriator vilket tar 24 tim, och bestäms sedan i mikroskop. Detta leder till att analys tiden för ett prov i genomsnitt är 2,5 tim med kapacitet att analyseras endast 8 prover per dag. En brist i metoden är att endast rörliga utvecklingsstadier (juveniler) analyseras och hänsyn tas inte till ägg som kan innehålla juveniler. Detta innebär att rotgallnematodspopulationen kan underskattas. I analyser baserade på molekylära metoder som PCR och LAMP, utvinns först totalt DNA som inkluderar alla utvecklings- och vilostadier från ett prov innan DNA- kopiering.

LAMP är en DNA- teknik som framför allt har använts inom klinisk verksamhet för snabb bestämning av humana bakterier, virus och svampar (Notomi m fl., 2000) och tekniken har också utvecklats för säker bestämning av flera växtpatogener (Niessen, & Vogel, 2010; Moradi m fl, 2013) och några växtparasitära nematoder i växt- och jordprover (Niu, m fl., 2011; Kang m fl., 2014). Med LAMP- teknologi kan analyserna genomföras med en enkel laborieutrustning, flera prover kan analyseras samtidigt och ett snabbt resultat tas fram på ca 60 min per analys.

2. Material och metod

2.1. Nematoder

Juveniler av rotgallnematod (andra utvecklingsstadiet J2) införskaffades från HZPC, Holland. Direkt vid ankomst placerades nematoderna kallt (4°C) med luftning. Rotsårnematoder drevs ut från majsrotter från en befintlig kultur i växthus på Ekologiceentrum, Uppsala. Nål-, stubbrots- och betcystnematoder erhöles från HS Nematodlaboratorium, Alnarp. Enskilda juveniler från varje nematodart plockades med nål under stereomikroskop och tillsattes i rör med 10 µl vatten. Proverna analyserades direkt eller förvarades vid -20° C tills användning.

2.2. DNA extrahering

Hur många juveniler per prov som skulle testas bestämdes först i samråd med Susanne Andersson, HS Nematodlaboratorium, Alnarp, för att kunna detektera *M. hapla* både vid den lägsta (vid toleransgräns, 1-4 J2/250 g jord) samt den högsta nivån som förekommer i marken i kommersiella fält (~ 80 J2/ 250 g jord). DNA extraherades sedan från 2, 4, 8, 16, 32 och 64 juveniler av rotgallnematod och rotsårnematod med ett kommersiellt kit (DNeasy Blood & Tissue kit, Qiagen, USA) enligt tillverkarens rekommendationer. Dessutom extraherades DNA med en enkel metod bestående av upphettning av juveniler i 10 µl vatten vid 95° C i 10 min. För de tre andra nematodarterna (nål-, stubbrots- och betcystnematod) extraherades DNA endast från 2 och 8 juveniler från varje nematod pga begränsade material av nålnematod. Nematodproverna förbereddes i tre upprepningar och varje LAMP eller realtids-LAMP analys upprepades minst två gånger. DNA kvantifierades med NanoDrop instrument som används för kvantifiering av DNA och RNA molekyler.

2.3. LAMP

DNA från rotgall- och rotsårnematoder analyserades enligt en publicerad LAMP-metod (Niu m fl. 2011), men med viss modifiering. Visuell detektering åstadkoms genom att tillsätta av färgindikatorn Hydroxy Naphthol Blue (HNB). HNB ger ett färgomslag från lila till blått vid positiv DNA- amplifiering. LAMP-reaktionen utfördes vid 63° C i 1 tim.

2. 4. Gel elektrofores

Prover från representativa LAMP-analyser analyserades vidare med gel elektrofores (1% agaros) för att bekräfta resultatet från LAMP-HNB analyser. Denna analys använder vi i forsknings sammanhang, men den behövs inte när LAMP-metoden används som rutinanalys.

2. 5. Realtids-LAMP

Utöver detektering av DNA med LAMP och färgämnet HNB, använde vi en realtids-version av metoden för att kunna följa DNA ampliferingen i realtid. Syftet var att testa om det är möjligt att kvantifiera DNA från enskilda juveniler. Realtids-LAMP analyserna genomfördes på en Realtids-PCR maskin vid 65° C i 1 tim.

2.6. Ny LAMP-metod med HSP-primrar

Nya primrar (korta enkelsträngade nukleinsyrasekvenser som sätter igång DNA-syntesen) designades från en specifik gensekvens (Heat Shock Protein 90, HSP) hos rotgallnematoden . DNA från rotgall-, rotsårs, nål-, stubbrots- och betcystnematoder analyserades med de nya designade HSP-primrarna enligt punkt 2.3 ovan, men vid 65° C i 1 tim.

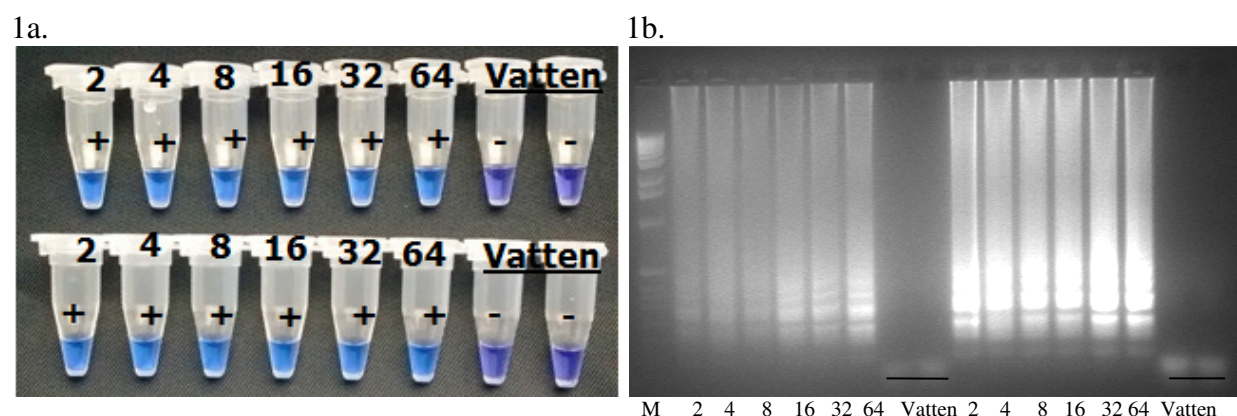
För att bestämma detektionsgränsen för metoden (lägst antal juveniler som kan detekteras), spädades DNA från 64 rotgallnematoder (motsvarande ca 10 ng/μl) i vatten. Spädningar (1/10 spädning) förbereddes i tre upprepningar och DNA- koncentrationen i varje spädning bekräftades med NanoDrop instrument. Utvalda LAMP analyser bekräftades med gel elektrofores och realtids-LAMP.

3. Resultat

3.1. Detektion av rotgallnematod med publicerad LAMP-metod

3. 1. 1. Detektion av rotgallnematoder

DNA amplifierades lika effektivt från DNA extraherat med kommersiellt kit som från DNA extraherat med upphettning vid 95° C. Därför användes denna enkla och billiga DNA extraktionsmetod i resten av undersökningarna. Med den publicerade LAMP-metoden (Niu m fl., 2011) detekterades rotgallnematodjuveniler i samtliga prover från 2 till 64 J2 och vattenkontrollen var alltid negativ (Figur 1a; b). Amplifierat DNA från rotgallnematod visualiserades enkelt genom HNB färgförändring från lila till blått (Figur 1a) och resultatet bekräftades med gel elektrofores (Figur 1b).

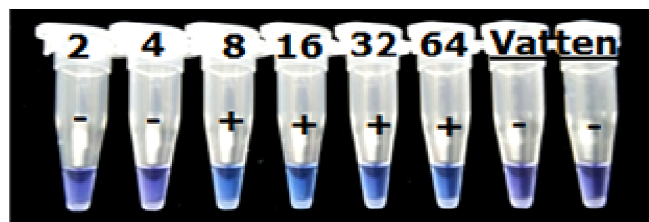


Figur 1a: LAMP reaktion med färgämnet Hydroxy Naphthol Blue (HNB). 2-64 juveniler av rotgallnematoder tillsattes i 10 μl vatten och upphettades vid 95° C i 10 min. Positiv DNA amplifering (+; blå färg); negativ vattenkontroll (-; lila färg), 1b: Bekräftelse av LAMP resultat med gel elektrofores (1 %), M: 100 bp DNA markör. Foto: Zahra Omer.

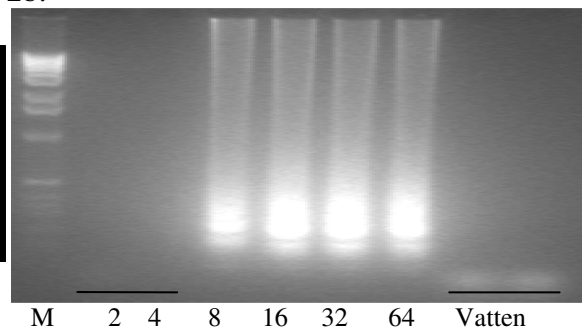
3.1.2. Specificitetstest med rotsårsnematoder

En undersökning av specificiteten av den publicerade LAMP-metoden visade att RKN (Root-Knot Nematodes)-primrar (Niu, m fl. 2011) kan amplifiera DNA från åtminstone 8-64 rotsårsnematoder (Figur 2a). Resultatet från LAMP med färgämnet HNB bekräftades med gel elektroforesen (Figur 2b). Analyserna upprepades flera gånger och samma resultat uppnåddes i varje analys med positiv DNA amplifiering i rotsårsnematod prover och negativ resultat i vattenkontroll.

2a.



2b.

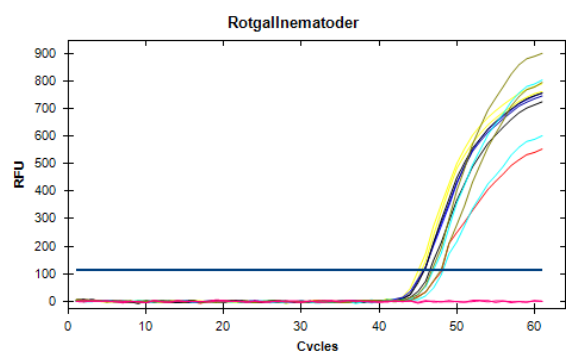


Figur 2a: LAMP reaktion med färgämne Hydroxy Naphthol Blue (HNB). 2-64 rotsårsnematoder tillsattes separat i 10 µl vatten och upphettats vid 95° C i 10 min. Positiv DNA amplifiering (+); negativ vattenkontroll (-), 2b: Bekräftelse av LAMP resultat med gel elektrofores (1 %), M: 100 bp DNA markör. Foto: Zahra Omer.

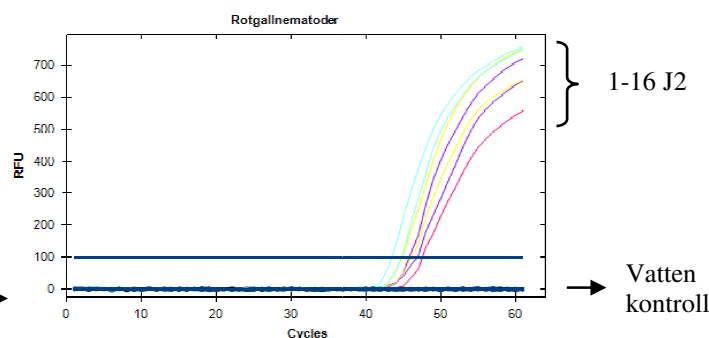
3. 1.3. Realtids-LAMP

I dessa analyser jämfördes först de två olika DNA extraheringsmetoderna, (a) kommersiellt kit och (b) upphettning vid 95° C. DNA extraherades från 1-16 rotgallnematodjuveniler med båda metoderna (Figur 3a;b), och därför valdes upphettningsmetoden även för realtids-LAMP. DNA från både rotgall- och rotsårsnematoder amplifierades i samtliga testade prover (2-64 J2) medan vattenkontrollen var negativ och visade ingen DNA amplifiering. Realtids analyserna bekräftade resultatet från LAMP med HNB, men här detekterades även DNA från 2 och 4 rotsårsnematoder (Tabell 1).

3a.



3b.



Figur 3a: DNA av rotgallnematod extraherat från 1-16 juveniler i vatten med DNeasy Blood & tissue kit, 3b: DNA från 1-16 J2 juveniler i 10 µl vatten, upphettat vid 95° C i 10 min. Ingen DNA amplifierades i vattenkontrollen. RFU (y-axel): en mätningenshet av positiv DNA amplifiering.

Värdena stämde bra med antalet nematoder och respektive DNA mängd (ng/ µl), såtillvida att högst antal nematoder har lägre reaktionstid dvs. högst antal nematoder har lägst Ct-värde (Cycle threshold) (Tabell 1).

Tabell 1. DNA från rotgall- och rotsårsnematoder extraherade med upphettning vid 95° C och amplifierade med realtids-LAMP vid 65°C i 1 tim

Antal juveniler	Rotgallnematod		Rotsårsnematod	
	DNA (ng/μl) ±Sd	Ct-värde ¹	DNA (ng/μl) ±Sd	Ct-värde
2	2,4±0,82	43,81	2,0±0,85	44,1
4	2,6±0,61	43,46	2,2±0,28	43,94
8	3,5±0,52	43,4	3,4±0,49	43,4
16	3,5±0,35	43,28	4,4±0,71	42,16
32	4,3±0,41	42,61	4,9±0,64	40,88
64	8,7±0,30	42,12	9,8±0,28	40,42

¹Ct-värde (Cycle Thershold) är antal cykler av DNA kopiering som behövs för att få ett positiv signal.

3.2. Detektion av rotgallnematod med nya HSP-primrar

3. 2. 1. Detektion av rotgallnematoder

Nya primrar behövde utvecklas i denna förstudie. Först designades flera primrar från olika gener, t ex ”alpha elongation factor”, och testades mot DNA sekvenser från olika nematoder i NCBI (National Center for Biotechnology Information) databasen. Ett set av 6 primrar som alla designats från Heat Shock Protein 90 (HSP) genen hos *Meloidogyne hapla* valdes ut. Sekvenser av HSP-genen från olika rotgallnematodarter jämfördes först med sekvensen från *M. hapla*. Den delen av *M. hapla* DNA:t som skiljde mest från de andra arterna användes för att designa *M. hapla* specifika primrar (Bild 1).

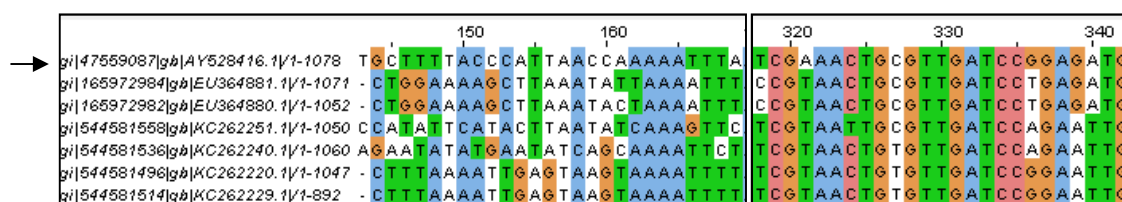
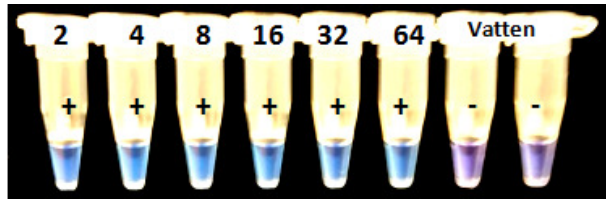


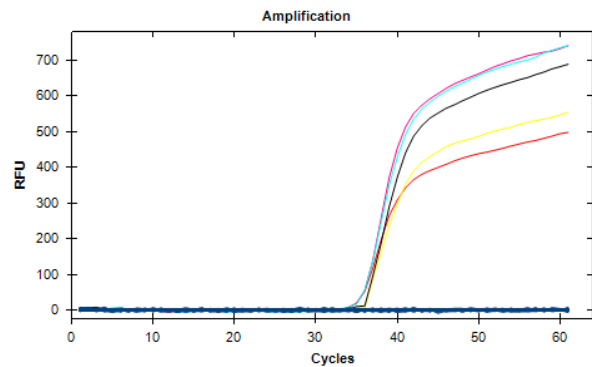
Bild 1. DNA sekvenser av HSP-genen från *M. hapla* (pil) samt från 6 andra rotgallnematodarter (*M. arinaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita*, *M. minor*, *M. naasi*) som valts ut för att designa fram och bak-primrar. Bilden visar variationen i DNA sekvensen mellan arterna (olika sammansättningar av bokstäver). Gruppering av DNA sekvenser (Multiple DNA Sequence Alignment) utfördes med ClustalW2 verktyg.

Sökningen i databasen visade inga signifikanta matchningar med DNA-sekvenser från andra nematoder utan det var DNA-sekvenser från *M. hapla* som fanns i sökningsresultatet med mer än 90% matchningsgrad. När HSP-primrarna användes i LAMP-analyserna med HNB, amplifierades DNA från alla rotgallnematodprover (2-64 J2) på samma sätt som i den publicerade metoden (Niu m fl., 2011). En tydlig blå färg visualiserades endast i rören med rotgallnematod DNA och ingen färgförändring skedde i rören med vattenkontroll (Figur 4a). Analyser med realtids-LAMP visade DNA amplifiering i samtliga rotgallnematodprover (Figur 4b).

4a.



4b.

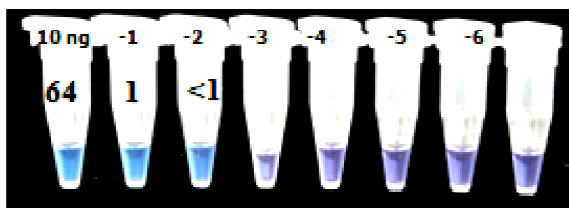


Figur 4a: Detektion av rotgallnematod med LAMP och HSP-primrar. 2-64 juveniler tillsattes i 10 μ l vatten och upphettades vid 95° C i 10 min. Positiv DNA amplifiering (+; blått); negativ vattenkontroll (-; lila), 4b: Respektive realtids-analyser (röda kurvan längst ner motsvarar 2 J2; rosa kurvan längst upp motsvarar 64 J2), RFU (y-axel): en mätningenshet av positiv DNA amplifiering. Foto: Zahra Omer.

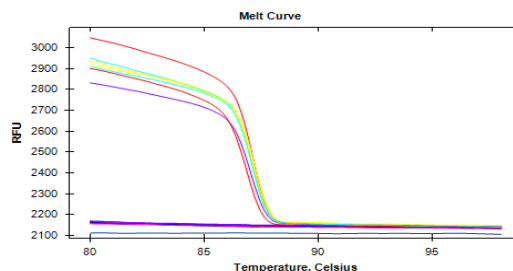
3.2.2. Detektionsgräns för rotgallnematoder

Den lägsta DNA koncentrationen som kunde detekteras med de nya HSP-primrarna var 100 pg/ μ l i LAMP, vilket motsvarar DNA från mindre än 1 juvenil (Figur 5a). Fluorescensstyrkan på agarosgel stämde också överens med LAMP-HNB resultatet, med svagare fluorescens ju mindre DNA koncentrationen i rören med blå färg (Figur 5a-b). Realtids-LAMP var känsligare än LAMP med HNB och därför kunde lägre koncentration, 10 pg/ μ l DNA, detekteras (Figur 5c-d).

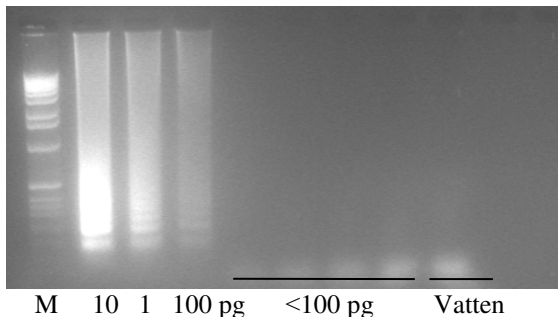
5a.



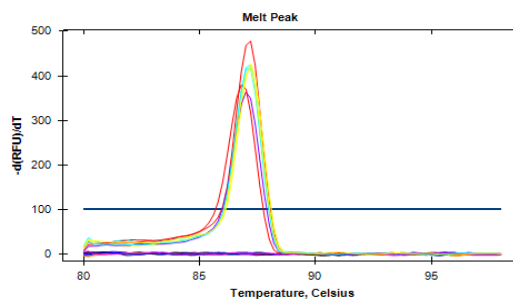
5c.



5b.



5d.



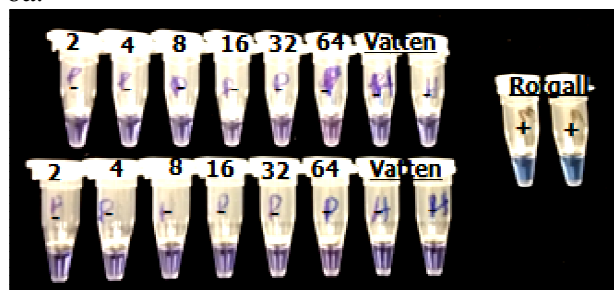
Figur 5a: Detektionsgräns av LAMP med HSP-primrar. Spädning av rotgallnematod DNA i vatten: 10 ng/ μ l DNA (motsvarar ca 64 juveniler); 1 ng/ μ l (motsvarar 1 juvenile); 100 pg (motsvarar DNA från <1 juvenil); vattenkontroll samt DNA spädningar i koncentrationer < 100 pg var negativa, 5b: respektive gel elektrofores analyser (1 %), 5c-d: DNA amplifiering i realtid från 10ng-10pg, vatten och spädningar < 10 pg var negativa. Foto: Zahra Omer.

3.2.3. Specificitetstest med andra nematoder

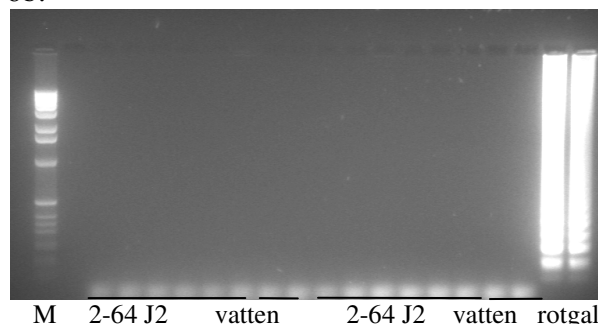
Specificiteten av HSP-primrarna granskades först mot rotsårsnematoder eftersom DNA från denna nematod amplifierades med LAMP-metod enligt Niu m fl. (2011). Samtliga analyser

utfördes med DNA extraherades från 2-64 J2. Förutom rören med DNA från rotgallnematod, syntes ingen färgförändring varken i rören med DNA från rotsårsnematoder eller i rören med vattenkontroll (Figur 6a). Resultatet bekräftades både med gel elektrofores (Figur 6b) och med realtids-LAMP (resultat visas ej).

6a.



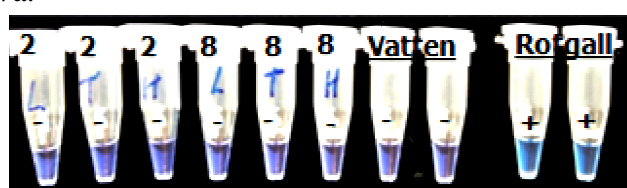
6b.



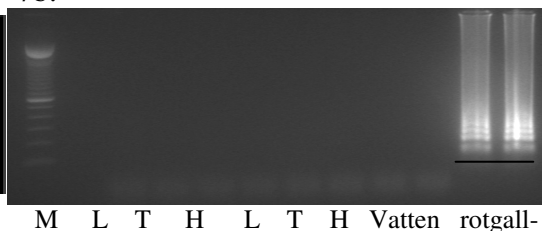
Figur 6a: Specificitet av LAMP med HSP-primrar mot 2-64 rotsårsnematoder. Positiv DNA amplifiering i rotgallnematod DNA (+); negativa vattenkontroll och rotsårsnematod DNA prover (-), 6b: Bekräftelse av LAMP resultat med gel elektrofores (1 %), M: 100 bp DNA markör. Foto: Zahra Omer.

Specificiteten av HSP-primrarna verifierades mot ytterligare tre nematodarter: nål-, stubbrots- och betcystnematoder. Analysresultaten visade ingen DNA amplifiering från dessa nematoder, vattenkontrollen var negativ och rören med rotgallnematod DNA visade positiv blå färg (Figur 7a). Samma resultat påvisades med gel elektrofores (Figur 7b) och realtids-LAMP (resultat visas ej).

7a.



7b.



Figur 7a: Specificitet av LAMP med HSP-primrar mot L= *Longidorus* spp (nålnematod), T= *Trichodorus* spp (stubbrottnematod) och H= *Heterodera schachtii* (betcystnematod) vid 2 och 8 juveniler. Positiv DNA amplifiering i rotgallnematod prover (+); negativ vattenkontroll och DNA från andra nematodprover (-), 7b: Bekräftelse av LAMP resultat med gel elektrofores (1 %), M: 100 bp DNA markör. Foto: Zahra Omer.

4. Diskussion

I denna förstudie testades en publicerad LAMP-metod för detektion av rotgallnematoden, *M. hapla* (Niu m fl., 2011). Vi använde samma procedur, men istället för att visualisera LAMP resultatet med det flurocerande färgämnet SYBR Green 1 valdes ett annat färgämne HNB, vilket har fördelen att direkt visualisera resultatet under dagljus utan behov av UV-ljus. HNB har en speciell förmåga att ändra färg i enlighet med pH-värde och mängden magnesium i provvätskan. När antalet DNA kopior ökar under en LAMP-reaktion sänks pH-värdet och mängden magnesium minskar, vilket får som konsekvens att färgen ändras från lila till blå (Goto m fl., 2009). På detta enkla sätt visualiserades DNA amplifiering från rotgallnematod, och så lite som 1-2 juveniler kunde detekteras, vilket stämde bra med det publicerade resultatet (Niu m fl., 2011).

I den andra delen av förstudien undersöktes specificiteten av den publicerade LAMP-metoden mot rotsårsnematod, eftersom denna nematod också kan förekomma i morotsodling här i Sverige. Ytterligare granskning av metodens specificitet mot andra nematoder har också

rekommenderats (Niu m fl., 2011). Våra resultat med både LAMP- och realtids-LAMP påvisade tydligt att metoden inte är tillräckligt specifik mot rotgallnematod och att den också kan detektera rotsårsmematod. Metoden utvecklades för att detektera tre andra rotgallnematodarter; *M. incognita*, *M. arenaria* och *M. javanica* förutom *M. hapla* (Niu m fl., 2011). Att metoden detekterar en grupp av flera rotgallnematoder med sk grupp-primrar är praktiskt, men därigenom riskeras specificiteten mot andra nematoder, i det här fallet mot rotsårsmematod. Att man valt att detektera flera arter samtidigt med samma analysmetod begränsar möjligheten att välja specifika DNA-sekvenser för att designa sk art-specifika primrar för just *M. hapla*.

Baserad på egen-designade primrar från HSP-genen hos *M. hapla* utvecklades en ny LAMP-metod. HSP-genen finns hos de flesta rotgallnematoder, men för att designa artspecifika primrar användes de delar av DNA-sekvensen i *M. hapla* som skiljde sig mest från respektive DNA-sekvens i andra rotgallnematodarter. I Sverige är *M. hapla* den vanligaste rotgallnematoden och i Europa finns även arter som t ex *M. fallax* och *M. chitwoodi*. Vilka är mycket allvarliga skadegörare som vi inte vill få in i Sverige. En specificitetsundersökning (sökning i NCBI databasen) tillämpades istället för riktiga LAMP-analyser, och denna sökning visade inga signifikanta matchningar med DNA-sekvenser från dessa rotgallnematodarter eller med andra nematoder. Metoden med de nya primarna testades sedan i flera analyser mot fyra andra nematodarter som är vanligt förekommande i södra Sverige; rotsårs-, nål-, stubbrots- och betcystnematoder. Analysresultaten från både LAMP- och realtids-LAMP samt gelelektrofores visade inga positiva DNA amplifieringar. Den nya metoden har en detektionsgräns på 100 pg/μl DNA i LAMP med HNB och 10 pg/μl med realtids-LAMP. Att LAMP med färgämnet HNB har lägre känslighet än realtids-LAMP kan bero på att provvätskan innehöll bl.a. olika enzymer. Båda DNA- koncentrationerna, 100 och 10 pg/μl, betydligt lägre än DNA från en enskild rotgallnematodjuvenil vilket motsvarar ca 2 ng/μl. Detta visar att metoden har en stor potential att detektera rotgallnematoder vid det ekonomiska tröskelvärde (1-4 J2/250 g jord), men detta måste först bekräftas med analyser av jordprover. Som i de flesta LAMP- studier, finns alltid möjlighet att öka känsligheten genom att optimera reaktionstemperatur, reaktionstid samt innehåll av provvätska (Tomlinson m fl., 2010).

Skördeförlusten som orsakas av rotgallnematoder är kopplad till nematodtätheten i marken (Gugino *et al.*, 2008), och därför är det viktigt att kvantifiera antalet nematoder före sådd för att kunna planera hållbara växtföljder. Vi undersökte också möjligheten att kvantifiera antalet juveniler med en realtids-LAMP version, något som inte är gjort tidigare, vilket är viktigt för praktiskt tillämpning av metoden. Artbestämning såväl som kvantifiering av rotgallnematod är fullt möjligt med den nya LAMP- metoden baserad på HSP-primrar. Genom att följa ökningen av DNA mängden över tiden kan antalet nematoder bestämmas utifrån mängden DNA i ett prov och tiden i minuter som tas för att få en positiv signal (amplifieringskurva).

Olika DNA-metoder har utvecklades för att detektera *M. hapla*, och baseras på att rotgallnematoden först måste drivas ut från växt eller jordprover innan analysen genomförs, vilket är både kostsamt och tidskrävande (Castagnone-Sereno m fl., 1995; Zijlstra, 1997; Nyoike m fl., 2012). En DNA-metod, realtids-PCR, som kan detektera och kvantifiera rotgallnematoder utan att nematoderna behöver drivas ut från jorden publicerades av Sapkota m fl., (2016). Sådana realtids-PCR metoder kräver dock att DNA- extraktionen måste utföras med speciella kommersiella kit. Rengöring i två steg kan också behöva tillämpas (Wallenhammar m fl., 2012) och DNA- extraktion och rengöring är den mest kostsamma delen av en realtids-PCR analys. LAMP är däremot mindre känslig för hämmande substanser

(Wang m fl., 2008) och i denna förstudie var en enkel provhantering i form av upphettning av juveniler i vatten i 10 minuter tillräckligt för detektion av rotgallnematod med både LAMP- och Realtids-LAMP. Sådana enkla och billiga provhanteringar har också rapporterats för DNA extraktion från jordprover i andra LAMP studier (Moradi m fl., 2013). För att göra metoden kommersiell måste *M.hapla*- DNAextraheras i jord i fortsatt utvecklingsarbete. Detta ger en analysmetod till en lägre kostnad som möjliggör en ökad provtagning och analys hos odlarna, riskzoner inom fält kan identifieras och precisionen i morotsodlingen ökas.

5. Slutsatser

- Med den publicerade LAMP-metoden detekterades DNA från 2-64 rotgallnematodjuveniler.
- Metoden var inte tillräckligt specifik och detekterade även rotsårnematoder.
- Vi utvecklade en LAMP-metod med nya HSP-primrar som är både känslig och specifik.
- Rotgallnematoder kan detekteras vid nivåer lägre än en juvenil per prov. Ingen DNA amplifiering förekom vid test mot fyra andra vanligt förekommande nematodarter; nål-, rotsår-, stubbrots- och betcystnematoder.
- Nästa steg blir att testa den nya metoden för analys av rotgallnematoder i jordprover från kommersiella fält.

6. Resultatförmedling

Poster presentationer:

Omer, Z., Viketoft, M., Andersson, S., Wallenhammar, A-C. Säker detektion av rotgallnematoder med LAMP-metod. Poster presentation, Brunnby Lantbrukar dagarna, 5-6 juli 2016; HIR konferens, 3-4 oktober 2016.

Populärvetenskaplig artikel:

Omer, Z., Wallenhammar, A-C., Andersson, S., Viketoft, M. Rotgallnematoder kan bestämmas med ny DNA-teknik. *Viola*, 2017, 4: 32-33.

7. Referenser

- Andersson, S. 2009. Rotgallnematod, ett ökande problem i morotsodling. Skånska Lantbruk, nr. 2. ISSN 1653-2368.
- Anonyma: <http://www.jordbruksverket.se/download/18.1954d9e7149c54a8a8a88178/1416407721354/A.+Winge+Frilevande+nematoder.pdf>
- Anonymb: <https://http://www.jordbruksverket.se/download/18.66bdb79e1599739d6177db2/1484309242581/Nyhetsbrev+januari+2017.pdf>
- Castagnone-Sereno, P., Esparrago, G., Abad, G., Leroy, F. & Bongiovanni, M. 1995. Satellite DNA as a target for PCR specific detection of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne hapla*. *Current Genetics* 28, 566-570. Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A and Hanaki, KI. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue. *Biotechniques*. 46:167-172.
- Gugino, B.K., Ludwig, J.W. & Abawi, G.S. 2008. An on-farm bioassay for assessing *Meloidogyne hapla* infestations as a decision management tool. *Crop Protection* 27, 785-791.
- Kang, J., Kim, A.-Y., Han, H. R., Moon, Y. S & Koh, Y. H. 2015. Development of two alternative Loop-mediated isothermal amplification tools for detecting pathogenic pine wood nematodes. *Forest Pathology*. 45,127-133.
- Modig, P. 2015. Frilevande nematoder i långliggande odlingssystemförsök. Slutrapport 2013-2014, RAPPORT NR 3/2015.
- Moradi, A., Almasi, M.A., Jafary, H & Mercado-Blanco, J. 2013. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *J of Applied Microbiol*. 1-13.
- Niessen, L & Vogel, R. F. 2010. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology*. 140: 183-191.

- Niu, J-H., Guo Q-X., Jian, H., Chen, C-L., Yang, D., Liu, Q & Guo, Y-D. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection*. 30, 1063-1069.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28: E63.
- Nyoiike, T.W., Mekete, T., Mcsorley, R., Weibelzahl-Karigi, E. & Liburd, O.E. 2012. Confirmation of *Meloidogyne hapla* on strawberry in Florida using molecular and morphological techniques. *Nematropica* 42, 253-259.
- Sapkota, R, Skantar, A & Nicolaisen, M. A TaqMan real-time PCR assay for detection of *Meloidogyne hapla* in root galls and in soil. *Nematology* 18, 147-154
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M. J & Boonham, N. 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiol.* 51, 650-657.
- Wallenhammar, A-C., Almquist, C., Söderström, M. & Jonsson, A. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*. 61, 16-28.
- Wang, D., Huo, G., Wang, F., Li, Y & Ren, D. 2008. Drawback of loop-mediated isothermal amplification. *African J of Food Science*. 2, 83–86.
- Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundamental and Applied Nematology* 20, 505-511.

Datum: 2017-03-30

Projektleddare

Verksamhetschef

SLU-interna projektägare anger kostnadsställe och projektnummer för utbetalning av medel inom SLU.

SLU-externa projektägare skall efter besked om godkänd slutrapport skicka faktura till:

SLU Fakturamottagning

Box 7090

750 07 Uppsala. Ange fakturareferens: 645LEN

Slutrapporten godkännes datum:

Johan Ascard
Verksamhetsledare

Kristina Santén
Chef för Enheten för
Samverkan och Utveckling