



Hushållnings
sällskapet



Slutrapport för Tillväxtfondens projekt nr: 2017/198

Effektivisering av rotgallnematod DNA extrahering från jord- direkt analys av jordprover

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



Rotgallnematod, foto av Zahra Omer, HS Konsult AB

2018-04-27

Sammanfattning

Jordanalys är en viktig åtgärd för att motverka skördeförlusten orsakas av rotgallnematod. De traditionella metoderna är tidskrävande och har låg kapacitet, däremot är molekylära metoder som PCR (Polymerase Chain Reaction) och Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) effektiva och snabba. DNA-extraktion är det första steget innan PCR och LAMP analyser, och det är särskilt svårt när det gäller jordprover eftersom organiska substanser i jorden kan kontaminera och därmed hämma DNA-amplifiering. Därför används kommersiella kit för både DNA-extraktion och rengöring från dessa substanser, vilket gör DNA-extraktionen till den mest kostsamma delen i analyskostnaden. Syftet med det här projektet var att optimera DNA-extraktionen och använda LAMP för detektion och kvantifiering av rotgallnematoden, *Meloidogyne hapla*, i jordprover. DNA-extraherades från två jordarter med olika lerhalt, till vilka 4 juveniler av rotgallnematod tillsattes i 250 mg jord. Fyra metoder för DNA-extraktion jämfördes, två kommersiella kit, en publicerad enkel metod som består av bl.a. upphettning av extrakten vid 95° C i 10 min och en modifierad version av denna metod. Bäst resultat av DNA-mängd- och kvalitet erhöles med FastDNA kit och den modifierade enkla metoden. I större jordprover med 250 g, tillsattes 4, 16, 32 och 64 juveniler per prov. DNA-extraherades från 10 g delprover med FastDNA kit. Resultatet visade skillnader mellan ler- och sandjord i både DNA-mängd- och kvalitet där högst DNA-mängd erhöles från sandjord i två av tre extraktioner. DNA från 250 mg jordprover amplifierades med realtids-LAMP medan inget DNA amplifierades från 250 g jordprover. Detta kan bero på att DNA-mängden från 250 g proverna minskade signifikant efter ett rengöringssteg med ett kommersiellt kit. Specificiteten av LAMP-metoden undersöktes mot rotsårs-, nål-, stubbrots-betcyst- och potatiscystnematoder med en ny färgindikator, och inget DNA amplifierades från någon av dessa nematodararter, vilket bekräftar metodens specificitet mot rotgallnematod.

1. Bakgrund

Konventionella analysmetoder av växtparasitära nematoder, t ex Seinhorst elutriator och Baermann metoden (Baermann. 1917; Seinhorst. 1964) följt av mikroskopisk-baserad bestämning av morfologiska karaktärer, är värdefulla och används för verifiering av nematodförekomst i jord. Dessa metoder är dock tidskrävande och inte alltid ger tydliga resultat, särskilt vid artbestämning av närbesläktade nematoder. En annan brist är att endast rörliga utvecklingsstadier (juveniler) analyseras och hänsyn tas inte till ägg som kan innehålla juveniler, vilket innebär att rotgallnematodpopulationen kan underskattas.

Diagnostiska metoder baserade på DNA-tekniker t ex PCR har ökat våra möjligheter att identifiera, kvantifiera och noggrant övervaka både växtpatogener och skadegörare. En annan DNA-teknik s.k. LAMP har utvecklats för säker detektion av en rad patogena svampar (Niessen & Vogel. 2010; Denschlag mfl. 2012) bakterier och växtparasitära nematoder (Niu m fl. 2011). I analyser med PCR och LAMP, extraheras först s.k. totalt DNA med samtliga utvecklingsstadier av nematoder som finns i ett prov, t ex ägg- och juveniler, innan DNA-amplifiering. Vid jämförelse mellan Baermann-metoden, utdrivning av rörliga juveniler från jord, och realtids-PCR, med totalt DNA, för kvantifiering av nematoder visades att realtids-PCR hade större känslighet, där även vilande och äggstadier av nematoder detekterades och kvantifierades, jämfört med Baermann-extraktionsmetod som är baserad på nematodernas rörlighet (Min mfl. 2012).

DNA-extraktion är det första steget för att kunna identifiera och kvantifiera DNA från olika medier. Extraktion av ren DNA från jord är särskilt svårt, eftersom organiska substanser i jord kan kontaminera DNA och därmed inhibera DNA-amplifieringen särskilt med PCR-metoder, och därför används antingen kommersiella kit eller komplicerade och tidskrävande

extraktionsprocedurer. LAMP-metoden är generellt mindre känslig för hämmande substanser jämfört med PCR (Wang mfl. 2008). Flera undersökningar med LAMP-metoden har visat att DNA från växtpatogena svampar kunde extraheras både från växt- och jordprover med enkel provhantering utan att använda kommersiella kit (Tani mfl. 2007; Niessen & Vogel. 2010; Denschlag mfl. 2012; Moradi mfl. 2013). Detta ger en analysmetod till en lägre kostnad och möjliggör en ökad frekvens av provtagning och analys hos odlarna som i sin tur ökar precisionsodling av morötter genom att identifiera riskzoner i fält.

Ett krav på en jordanalys är att den ska fungera som rutinmetod för analys av olika jordarter. Inverkan av jordtypen på DNA mängd- och kvalitet har rapporterats i vissa studier. Sato mfl. (2010) undersökte olika jordarter med tillsats av samma antal rotsårsmatoder (1000/ 20 g jord) och realtids-PCR analys visade signifikanta skillnader mellan de testade jordtyperna. Andra studier har däremot inte visat skillnader i DNA-mängd på grund av skillnader mellan jordarter (Brierley mfl. 2009), och därför är det viktigt att extrahera rotgallnematod DNA från både sand- mo jordar respektive lerjordar och jämföra DNA mängden innan LAMP-analyser utförs.

Hypoteser:

1. Rotgallnematod- DNA kan effektivt extraheras med både kommersiellt kit och en enkel provhantering baserad på upphettning vid 95° C i 10 min.
2. Det finns skillnader i mängd extraherad DNA från olika jordarter med samma antal tillsatta juveniler.
3. Den utvecklade LAMP-metoden kan detektera rotgallnematod- DNA extraherat från jordprover också vid toleransgränsen (1-4 juveniler/250 g jord).
4. Rotgallnematoder i jordprover kan detekteras och kvantifieras med realtids-LAMP.

2. Material och metod

2.1. Jordanalys

Nematodfri sandjord och lerjord samlades från två olika fält i Uppsalatrakten. Ett generalprov per jordtyp skickades till Agrilab AB, Uppsala, för kemiskanalys (NIR) (Tabell 1). Jorden förvarades sedan i ett kylrum på Ekologocentrum, SLU, Uppsala.

Tabell 1. Kemisk analys, jordart och mängd totalkol i de undersökta jordarna

	pH	P-AL mg/100g	K-AL mg/100g	Mg-AL mg/100g	Mull %	Ler %	Silt %	Sand %	C-t ³ g/Kg	Jordart
S ¹	6,1	3,6	6,4	3,9	1,5	5,0	18,0	75,5	11,2	mf svl Sa
L ²	6,6	22,5	33,9	20,2	3,9	39,2	43,8	13,1	24,7	mmh ML

¹S= sandjord; ²L= lerjord; ³Totalkol.

2.2. Nematoder

Rotgallnematod andra utvecklingsstadiet (J2) av *M. hapla* införskaffades från HZPC, Holland 2016, och dessa har sedan hållits i kultur på tomatplantor i en klimatkammare på Ekologocentrum, SLU. På samma sätt hålls även en kultur av rotsårsmatoden *Pratylenchus penetrans* på Ekologocentrum. Rotgallnematoder och rotsårsmatoder drevs ut från tomatrötterna medan individer av nål-, stubbrots-, potatiscyst- 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. Rören med juveniler placerades i en behållare fyllt med flytande kväve och frystes och tinades 3 ggr, värmdes upp vid 95°C i 10 min och förvarades sedan vid -20°C tills användning i LAMP-analyser (Omer mfl. 2017).

2.3. Jordförberedning och artificiell inokulering med rotgallnematod

Fältjorden steriliserades med autoklavering, torkades i rumstemperatur och inokulerades med ett bestämt antal rotgallnematoder till både ler- och sandjord:

i) Fyra juveniler tillsattes i rör med 10 µl vatten, sedan tillsattes 250 mg jord per rör. Samtliga rör torkades ytterligare två dagar sedan homogeniserades med en skakmaskin (Retsch™ MM 400 Mixer Mill).

ii) 0; 4; 16; 32 och 64 juveniler tillsattes i rör och behandlades som ovan. Jord- och juveniler mixen tillsattes sedan i 250 g jord i en liters plastburkar med stål muttrar och homogeniserades med en särskild skakutrustning på SLU, Skara enligt Wallenhammar mfl. (2012).

2.4. DNA extraktion

2.4.1. DNA extraktion från 250 mg jordprover

DNA extraherades från hela 250 mg jordprovet med fyra metoder; ”FastDNA 2 ml kit for soil, MP Biomedicals” och ”Nucleospin kit for soil, MACHerey-Nagel”, en enkel metod och en modifierad version av den enkla metoden. DNA extraktioner med de kommersiella kiten utfördes enligt tillverkarnas rekommendationer. Enkel metoden utfördes enligt Moradi mfl. (2013) där 300 µl skummjolk tillsattes i varje rör med 250 mg jord. Rören homogeniserades, centrifugerades och extrakten upphettades vid 95° C i 10 min. I den fjärde metoden utfördes enkel metoden som ovan, men med modifiering av ett extra steg av DNA -utfällning med natriumacetat och 70 % etanol. DNA från samtliga extraktioner eluerades i 100 µl vatten. I en extra omgång med 250 mg jordprover extraherades DNA med FastDNA 2 ml kit och eluerades i 50 µl istället för 100 µl vatten.

2.4.2. DNA extraktion från 250 g jordprover

Olika antal juveniler inokulerades för att generera olika rotgallnematodnivåer enligt punkt 2.3. Från ett 250 g prov användes 10 g för DNA extraktion med en större variant av FastDNA kit med 50 ml rör som ger möjlighet för DNA extraktion från upp till 10 g jord/prov. Tre delprover, vardera 10 g, analyserades per rotgallnematodnivå. Skakmaskinen på DNA laboratoriet på Ekologocentrum, SLU, Uppsala saknade en adapter för 50 ml rör för homogeniseringen av 10 g delproverna. DNA extraktionerna utfördes därför istället på DNA laboratoriet på SLU, Skara och sedan transporterades DNA proverna till Uppsala. DNA från 10 g jord eluerades i 3 ml vatten, koncentrerades genom utfällning med natriumacetat och 70 % etanol och rengjordes med ”DNA Clean & Concentrator™, Zymo” kommersiell kit. Den slutlig DNA volymen i vatten var 50 µl. DNA från samtliga extraktioner kvantifierades med ett laboratorieinstrument (NanoDrop).

2. 5. Realtids-LAMP

Analyserna genomfördes på en Realtids-PCR maskin, DNA laboratoriet, Ekologocentrum, SLU, vid 65° C, sedan vid 98-80° C i 1 tim. Reaktionsvätskans innehåll per 30 µl: 15 µl ISO-001 master mix (OptiGene, UK); 5 µl HSP-primrar mix och 10 µl DNA.

2. 6. Visuell detektion av rotgallnematod DNA och specificitet undersökningar

Detektion av DNA från 2-64 J2 av rotgallnematod samt specificitet undersökningarna som utförts i en tidigare förstudie (Omer mfl. 2017), upprepades med ett nytt färgämne för att skaffa bilder med bättre kvalitet för vetenskaplig publicering. Förutom de fyra nematodarerna som testades i förstudien, undersöktes också DNA från potatiscystnematod. Juveniler tillsattes i rör med 10 µl vatten och behandlades som punkt 2.2 (Omer mfl. 2017). Visuell detektion gjordes efter tillsättning av en färdig reaktionsvätska (WarmStart colorimetric LAMP master

mix, NEB) som innehåller färgindikatorn ”phenol red”. Den nya färgindikatorn ger ett färgomslag från rosa till gult vid positiv DNA- amplifiering. LAMP-reaktionen utfördes vid 65° C i 1 tim.

2.7. Statistisk analys

Skillnader mellan jordarter samt skillnader mellan DNA extraheringsmetoder jämfördes med Tukey’s test (Statistica version 11, StatSoft).

3. Resultat:

3.1. Jordanalys

Den kemiskanalysen visade skillnader i ler- och sandhalter, mineraler och totalkol mellan de två jordarterna (Tabell 1). Sandjord innehöll 5 % lera medan lerjord innehöll 39 % lera. Lerjorden innehöll dubbelt så mycket totalkol än sandjorden (Tabell 1).

3.2. DNA extraktion

3.2.1. DNA extraktion från 250 mg jordprover

Två kommersiella kit för DNA extraktion från jord jämfördes för att välja det effektivaste kitet. DNA extraktionerna genomfördes med en mindre jordmängd (250 mg) innan undersökningar med de stora jordmängderna (250 g) som används för rotgallnematodanalyser på HS Nematod Laboratoriet, där resultatanalys anges som antal juveniler/250 g jord. Vid jämförelse av de båda kommersiella kiten gav Fast DNA kit högre mängder och bättre DNA kvalitet än Nucleospin kit (Tabell 2). Dessa skillnader var statistiskt signifikanta (Tabell 3). Extraktioner med den enkla metoden resulterade i högst DNA mängd jämfört med de andra testade metoderna men däremot var DNA kvaliteten lägre (≤ 1.5) (Tabell 2). Den modifierade versionen var bättre än den ursprungliga enkla metoden när det gäller DNA kvalitet (kvoten $260/280 = 1,5$), och den var inte heller statistiskt skild från det kommersiella FastDNA kitet vad det gäller både DNA mängd- och kvalitet (Tabell 3). DNA- mängden i medeltal från ler- och sandjord var lika och DNA från lerjorden hade signifikant bättre kvalitet än sandjorden (Tabell 3).

Tabell 2. DNA-mängd från 250 mg sand- och lerprover extraherad med fyra olika metoder

Prov	Antal	Medel DNA mängd (ng/μl)				DNA kvalitet (260/280) ⁶			
		J2	DNA ³ kit 1	DNA ⁴ kit 2	Enkel metod	Enkel Metod ⁵	DNA kit 1	DNA kit 2	Enkel metod
Kontroll ¹	0	16	5	135	9	1,5	1,2	1,2	1,5
S-4 J2	4	17	5	156	16	1,4	1,2	1,2	1,4
Kontroll ²	0	12	5	148	13	1,6	1,2	1,3	1,5
L-4 J2	4	14	5	143	19	2,0	1,4	1,3	1,5

¹Sand (mf svl Sa) kontroll utan tillsatta rotgallnematod juveniler; ²Lera (mmh ML) kontroll utan tillsatta rotgallnematod juveniler; ³FastDNA 2 ml kit for soil; ⁴Nucleospin kit for soil; ⁵Modifiererad enkel metod; ⁶kvoten (260/280) indikerar kontaminering av DNA med proteiner, värde för ren DNA ska vara $>1,7$. Varje behandling undersökts i tre rör (n=3).

DNA extraktionen upprepades men då endast med FastDNA kitet. DNA volymen minskades från 100 till 50 μl och på så sätt blev den mer koncentrerad än i de tidigare extraktionerna och medel DNA- mängden ökade från 13 ng/μl till 26 ng/μl (sandjord) och 19 ng/μl (lerjord) (Tabell 4). Från sandjorden extraherades större DNA- mängd än från lerjorden, men skillnaden var inte statistik signifikant på grund av variationer i DNA mängder (Tabell 4).

Tabell 3. Medelvärde av DNA mängd extraherad med tre metoder

	Medel DNA mängd (ng/µl)	Medel DNA Kvalitet (260/280)
Nucleospin kit	4,9 a	1,28 b
Fast DNA 2 ml kit	15,6 b	1,46 a
Enkel metod (modifierad) ¹	17,4 b	1,47 a
S ²	13 a	1,34 a
L ³	13 a	1,46 b

¹DNA metoden modifierade med ett extra steg av DNA utfällning; ²Sand (mf svl Sa); ³Lera (mmh ML). Olika bokstäver visar statistiskt signifikanta skillnader enligt Tukey's test, $p < 0.05$, (n= 3).

Tabell 4. DNA mängd och Ct-värde från 250 mg jordprover analyserade med realtids-LAMP

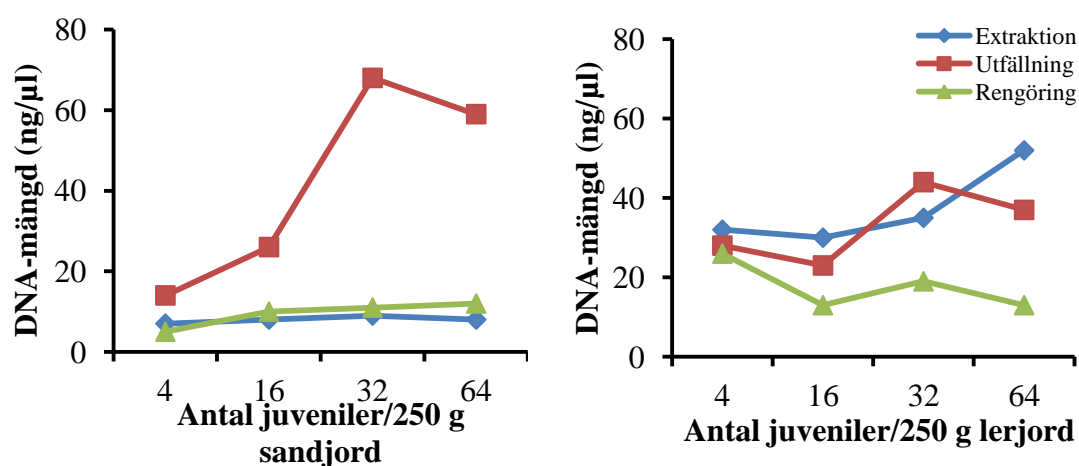
Prov	Antal J2 ¹	Medel DNA (ng/µl)	Medel Ct-värde ⁵
Kontroll ²	0	28	N/A ⁶
S-4 J2	4	26 a	40 a
Kontroll ³	0	20	N/A
L-4 J2	4	19 a	43 a
Kontroll ⁴	4	-	38

¹Andra utvecklingsstadiet juveniler; ²Sandkontroll utan tillsatta rotgallnematod juveniler; ³Lerakontroll utan tillsatt rotgallnematod juveniler; ⁴Vattenkontroll med 4 tillsatta juveniler; ⁵Ct-värde (cycle threshold); ⁶N/A (DNA amplifierades inte från sand eller lera kontrollprover), (n=3).

3.2.2. DNA extraktion från 250 g jordprover med FastDNA 50 ml kit

Den stora varianten av FastDNA kit ger möjlighet för extraktioner från upp till 10 g jord, men samtidigt elueras DNA i större vattenvolym och därigenom blir DNA mycket utspätt, och därför gjordes ett extra steg av DNA- utfällningen för att koncentrera DNA.

DNA mängden från sandjorden var lägre än 20 ng/µl medan DNA från lerjorden var högre än 20 ng/µl och ökade med antalet juveniler (Fig. 1). Efter DNA- utfällning ökade DNA-mängden för sandjorden och blev högre än respektive mängd från lerjorden. I det sista steget med rengöring, minskade DNA mängden signifikant i både jordarter (Tabell 5). Både utfällning och rengöring gav lägre DNA kvalitet 260/280 kvot jämfört med mätningar direkt efter extraktion med FastDNA kitet (Tabell 5).



Figur. 1. DNA- mängder från sand- och lerjord inokulerad med 4, 16, 32 och 64 J2 rotgallnematod juveniler efter extraktion med FastDNA kit, koncentration och rengöring med Zymo kommersiell kit (n= 3).

Tabell 5. Medel värde av DNA mängd- och kvalitet

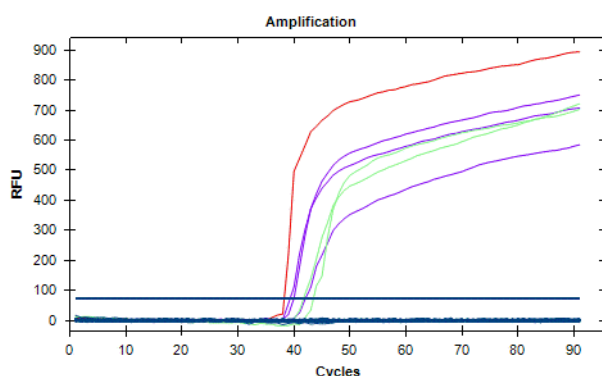
Steg	Medel DNA mängd (ng/μl)	Medel DNA kvalitet (260/280)
Extraktion	23 ab	5 b
Utfällning	42 b	1,3 a
Rengöring	21 a	1,2 a

Olika bokstäver visar statistiskt signifikanta skillnader enligt Tukey's test (n= 3), $p < 0.05$.

3.3. Realtids- LAMP

3.3.1. Analyser med DNA från 250 mg jordprover

I extraktionerna med de fyra testade metoderna amplifierades DNA från endast ett prov med 4 juveniler i sand extraherad med FastDNA kit, och därför valdes detta kit ut för vidare analyser. Den positiva kontrollen med 4 juveniler i vatten visade också en amplifieringskurva med realtids-LAMP (resultat visas ej). Att DNA amplifierades från endast ett rör betyder också att DNA måste koncentreras ner bl.a. genom att minska den slutliga DNA volymen innan LAMP-analysen. När DNA volymen minskades, amplifierades DNA från samtliga rör med sandjord, två av tre rör med lerjord samt den positiva kontrollen med 4 J2 i vatten (Fig. 2). DNA från sand- och lerjordskontroll utan juveniler amplifierades inte i LAMP-analysen (Tabell 4). Sandjord hade lägre medel Ct-värde (DNA amplifiering tar mindre tid) än lerjord, vilket stämmer med de högre DNA mängderna från sand (Tabell 4; Fig. 2).



Figur 2. DNA amplifiering med realtids-LAMP. Röda linjen: positivkontroll med 4 J2 i vatten; lilalinen: 250 mg sandjord med 4 tillsatta J2; grönilinen: 250 mg lerjord med 4 tillsatta J2. RFU (y-axel): en mätningseenhet av positiv DNA amplifiering. Motsvarande DNA mängder och Ct-värde visas i Tabell 4. (—): 4 J2 i vatten; (—): 4 J2 i sand; (—): 4 J2 i Lera.

3.3.2. Analyser med DNA från 250 g jordprover

DNA från 250 g jordprover visade ingen DNA amplifiering med realtids-LAMP.

Positivkontroll med 4 juveniler visade DNA amplifiering (resultat visas ej).

3.4. Visuell detektion av rotgallnematod

LAMP med den nya färdiga reaktionsvätskan "master mixen" och färgindikator "phenol red" var enklare att utföra än den tidigare testade master mixen med färgindikator "Hydroxy Naphthol Blue" (Omer mfl. 2017). "Phenol red" ändrar färgen från rosa till gult och skillnader mellan positiv och negativ LAMP-reaktion blir mer tydligare. Rotgallnematod- DNA detekterades vid samtliga nivåer, 2-64 J2, med färgförändring från rosa till gult och ingen färgförändring upptäcktes i rör med vattenkontroll (Bild.1).

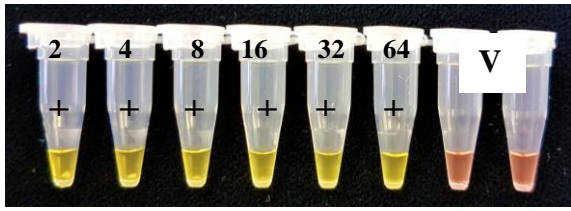


Bild. 1. Detektion av rotgallnematod (2-64 Juveniler) med art-specifika HSP-primrar. Positiv DNA amplifiering visualiseras med gul färg; V: ingen färgförändring i vattenkontroll utan juveniler (rosafärg). Foto: Zahra Omer.

3.5. Specificitet undersökning

Specificitet av HSP-primrar mot rotgallnematod bekräftades igen med den nya färgindikatorn phenol red. Förutom de testade nematodarerna i förstudien (Omer mfl. 2017), undersökts även DNA från potatiscystnematod. Ingen DNA amplifiering upptäcktes från de fem testade nematodararter (Bild. 2). Positiv DNA amplifiering visualiseras med gul färgning i rör med rotgallnematoder.

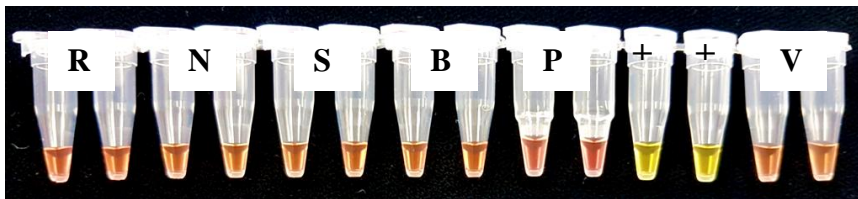


Bild. 2. Specificitet undersökning med LAMP och färgindikatorn phenol red, 4 J2 av varje nematodart upprepade i två rör: ingen färgförändring i rör med DNA från, R: rotsårs- N: nål- S: stubbrots- B: betcyst- och P: potatiscystnematod (rosafärg); +: positiv DNA amplifiering visualiseras med gul färg i rör med DNA från rotgallnematod; V: vattenkontroll (ingen färgförändring i negativ vattenkontroll, rosafärg). Foto: Zahra Omer.

4. Diskussion

En DNA-metod baserad på LAMP teknologi för detektion av rotgallnematod, *M. hapla* utvecklades i en tidigare förstudie (Omer mfl. 2017). Det övergripande målet var att ge näringen, odlare och rådgivningsbranschen tillgång till en snabb och säker DNA-baserad analysmetod för att identifiera och kvantifiera rotgallnematoder i jord. Innan tillämpning av metoden för analys av naturligt smittad jord från kommersiella fält, krävdes flera undersökningar, dels för effektivisering av DNA- extraktion från jord och dels för att testa om jordtypen kan påverka analysresultatet. För att genomföra dessa undersökningar användes två nematodfria jordtyper med olika lerhalter som inokulerades artificiellt med ett bestämt antal juveniler av rotgallnematod. Effektivisering av DNA- extraktionen genomfördes i mindre jordprover (250 mg) med 4 tillsatta juveniler innan undersökningar i större jordprover (250 g) med olika nematodnivåer.

DNA- extraktion från jord är en stor utmaning jämfört med extraktion från t ex växtmaterial. Jord innehåller organiska substanser som humussyra och fenoler som kan hämma DNA amplifiering med PCR-metoder (Tebbe & Vajhen. 1993). Humussyra har liknande storlek- och laddningskaraktär som DNA, därför elueras den tillsammans med DNA vid extraktion från jordprover och påverkar därmed DNA mängd- och kvalitet (Yeates mfl. 1998). Flera studier har just fokuserat på att optimera extraktionsmetoder för att producera ren DNA från jord (Miller mfl. 1999; Tanase mfl. 2015). Förutom humussyra påverkas också DNA-kvaliteten av proteiner. DNA mängd- och kvalitet kvantifieras med spektrofotometri vid vissa våglängder. DNA absorberas vid 230 nm, medan humussyra och proteiner absorberas vid 260 och 280 nm (Yeates mfl. 1998), därför används kvoten 260/230 för att bedöma DNA kontaminering med humussyra och 260/280 för att bedöma kontaminering med proteiner. I DNA extraktioner eftersträvas alltid en 260/230 kvot som är >2 för DNA rent från humussyra och en 260/280 kvot som är >1,7 för DNA rent från proteiner.

I det här projektet jämfördes två kommersiella kit med en publicerad enkel metod som bestod av användning av skummjolk och upp hettning vid 95° C i 10 min (Moradi mfl. 2013). Skummjolk ingår i de flesta DNA extraktionsprocedurerna (Cheng mfl. 2016). Skummjölken binds till lerpartiklar- och humussyra och minskar på så sätt DNA kontaminering. Vi noterade en minskning av den bruna färgen när skummjolk tillsattes, vilket stämmer av med de rapporterade effekterna. Däremot amplifierades inte DNA som extraherades med denna enkla metod med Realtids-LAMP. I andra studier bekräftades tålighet hos LAMP mot vanliga inhiberingssubstanser såsom humussyra, Triton 100-X och urea (Tani mfl. 2007). Att vi inte fått DNA- amplifiering med DNA extraherat med den enkla metoden kan bero på de låga DNA-mängderna. Vi testade också en modifierad version av den enkla metoden. Den nya modifierade metoden var signifikant bättre än den publicerade metoden (Moradi mfl. 2013) när det gäller kontaminering med proteiner (260/280= 1,5). Dessutom var DNA mängd- och kvalitet värdena liknande respektive värde som erhållits med FastDNA kommersiell kit med dubbla vattenvolymen, vilket delvis bekräftar hypotes 1: att rotgallnematod- DNA effektivt kan extraheras med både kommersiellt kit och en enkel provhantering baserad på upphettning vid 95° C i 10 min.

Resultatet visade skillnader mellan de två testade jordarterna för både DNA mängd- och DNA kvalitet. De bästa Realtids-LAMP resultaten erhöles med DNA som extraherats från sandjord. Kemiska analyser bekräftade skillnader mellan de jordarterna i ler- och totalkol mängder, vilket delvis förklarar resultatet eftersom dessa komponenter är källor till humussyra (Yankson & Steck. 2009). Dessutom kan sand ge bättre homogeniseringseffekt på proverna. Vanligtvis homogeniseras prover genom att tillsätta en mängd kisel eller glaspulver (glass beads) i ett prov och vid skakning av provet öppnas cellmembranen hos t ex nematoder och DNA frigörs i en extraktionsbuffert. Det kan också noteras här att FastDNA kommersiella kitet har bättre homogeniseringsmaterial jämfört med det andra testade kitet, och därför var mängden extraherat DNA signifikant större än respektive mängder extraherade med Nucleospin kitet. Resultatet bekräftar skillnader mellan de två testade jordarterna och därmed hypotes 2: att det finns skillnader i mängd extraherad DNA från olika jordarter med samma antal tillsatta juveniler.

De första två DNA- extraktionerna visade framförallt att DNA mängden var låg och det är osannolikt att kunna detektera eller kvantifiera rotgallnematod i 250 g jord om DNA extraheras från endast ett 250 mg delprov som tas från ett sådant 250 g jordprov. En nematod innehåller ca 959 celler (Felix. 1997), om fyra nematoder blandas i 250 g jord ger detta teoretiskt 4 celler per 250 mg delprov. Enligt resultatet och dessa beräkningar krävs ca 20 g delprover utifrån ett 250 g jordprov för att kunna detektera rotgallnematod vid toleransgränsen, (1-4 J2/250 g jord). Andra studier rekommenderar jordmängder mellan 10-20 g för att analysera nematoder i jord (Goto mfl. 2011; Min mfl. 2012). Vanligtvis används jordmängder mellan 250-500 mg jord för analys av mikroorganismer i jord eller växtprover (Wallenhammar mfl. 2012). Större jordmängder kan däremot ge mer pålitligt resultat eftersom nematodförekomsten kan variera stort över ett fält (MacMillan mfl. 2006), och av samma anledning genomförs morfologiskalanalyser av nematoder i 200-250g jordprover (Waite mfl. 2003). I den tredje extraktionen användes högre jordmängd (10 g delprover), men samtidigt var DNA mycket utspätt i 3 ml vatten. Almquist mfl. (2016) testade också den stora varianten av FastDNA 50 ml kit för att öka start jordmängden från 350 mg till 10 g i DNA extraktioner från jordprover infekterade med rotbrand patogenen *Aphanomyces cochlioides* i sockerbetor. Detektionsgränsen av *A. cochlioides* med Realtids-PCR gick inte att förbättra genom att använda 10 g delprover på grund av det mycket utspätt DNA. Vi tillämpade ett extra steg av

utfällning som koncentrerade ner DNA till ca dubbelt så stor DNA-mängd jämfört med mängden direkt efter extraktionen. Det här extra steget kan också tillämpas för att öka DNA mängden från infekterade jord med *A. cochliformis* i framtida undersökningar. När DNA-renades med Zymo kommersiellt kit minskade däremot DNA- mängden signifikant, varför ingen DNA- amplifiering upptäcktes med realtids-LAMP. Det finns andra kommersiella kit för DNA rengöring (Wallenhammar mfl. 2012), som kräver en extra utrusning (Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold) som saknas på laboratoriet i Uppsala. Transporten av DNA-prover från Skara till Uppsala kan möjligen ha påverkat resultatet. Vi strävar efter att införskaffa sådan utrustning och genomföra samtliga analyser i framtiden på en och samma plats.

DNA- extraktion från delprover >250 mg jord ger bättre indikation om nematodförekomst, men kräver samtidigt mer analys-tid. Vidare kan optimering av realtids-LAMP öka känsligheten och därmed minska jordmängden som används för DNA extraktion. Kemikalier som "betaine", "dimethyl sulfoxide (DMSO)" och "bovine serum albumin" används för att öka känsligheten av realtids-PCR (Frackman mfl. 1998; Almquist. 2016). Tillsättning av 7,5 % DMSO i LAMP reaktionsvätska ökade känsligheten kraftigt. Metoden har också optimerats med ett extra upphettningsteg vid 95° C i 5 min innan LAMP start (Wang mfl. 2015). Sådana åtgärder kan undersökas i framtiden för att förbättra rotgallnematod analysen med realtids-LAMP.

Den nya färdiga reaktionsvätskan med färgindikatorn "phenol red" har förenklat färgade LAMP- analyser och samtidigt förtydligat den visuella bedömningen av reaktionerna. Skillnaden mellan positiva (gult) och negativa (rosa) reaktioner var tydlig och inga andra färgnyanser syntes som förkom i vissa fall med tidigare färgad-LAMP och färgindikator "Hydroxy naphthol blue" (Omer mfl. 2017). Upprepade undersökningar med de fyra nematodarerna som testades tidigare, bekräftade specificiteten av de designade primrarna mot rotgallnematod. I det här projektet testades även potatiscystnematod som är vanlig i grönsaksodling, och ingen DNA amplifiering noterades heller i detta fall.

5. Slutsatser

- Fyra DNA- extraktionsmetoder som testades gav olika DNA mängder- och kvalitet. Det kommersiella kitet FastDNA kit gav bäst resultat.

- DNA mängderna var generellt låga varför inget DNA amplifierades med realtids-LAMP från 250 g jordprover som extraherades med de fyra testade metoderna inklusive den publicerade enkla metoden.

- Vi valde att fokusera på en DNA- extraktionsmetod, FastDNA kit, på grund av begränsade resurser. Vidare optimering av den enkla metoden, där även skillnader i jordtyper ska beaktas, skulle ge bättre resultat och kan fungera som rutinmetod för extraktion av rotgallnematod-DNA från jord.

- Den nya färgade-LAMP med färgindikatorn "phenol red" är enklare och ger tydligare visuell bedömning av LAMP- resultat jämfört med den först utvecklade LAMP med färgindikatorn "Hydroxy naphthol blue". Metoden kan tillämpas i kombination med Seinhorst eluttrationsmetod för diagnos av rotgallnematod på HS nematodlaboratorium.

6. Resultatförmedling

1. Projektet resultat presenteras på ESN nematodkonferens, 9-13 september 2018, Gent, Belgien. En sammanfattning skickas in den 15 maj. <https://www.esn-online.org/conference>.
2. Ett manuskript skickas till "Journal of Nematology" för vetenskaplig publicering.

7. Referenser

- Almquist, C. 2016. Monitoring important plant pathogens in Swedish crop production using Real-time PCR. Doctoral Thesis NO. 2016:26. SLU.
- Almquist, C., Persson, L., Olsson, Å., Sundström, J., Jonsson, A. 2016. Disease risk assessment of sugar beet root rot using quantitative real-time PCR analysis of *Aphanomyces cochlioides* in naturally infested soil samples. *European Journal of Plant Pathology*. 145:731-742.
- Baermann, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden)-Larven in Erdproben. *Weltevreden Batavia, Geneesk. Lab. Feestbundel*: 41-47.
- Brierley, J., Stewart, J., Lees, A. 2009. Quantifying potato pathogen DNA in soil. *Applied Soil Ecology*. 41: 234-238.
- Cheng, F., Woeste, K., Shang, Z., Peng, X., Zhao, P., Zhang, S. 2016. Soil pretreatment and fast cell lysis for direct polymerase chain reaction from forest soils for terminal restriction fragment length polymorphism analyses of fungal communities. *Brazilian J of Microbiology*. 47: 817-827.
- Denschlag, C., Vogel, R. F & Niessen, L. 2012. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int. J. Food Microbiology*. 156: 189-196.
- Felix, M.A. 1997. One worm, 959 cells and 13,000 genes. *M/S: Médecine/Sciences* 13, 156-165.
- Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., Storts, D. 1998. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*. 65: 27-30.
- Goto, k., MIN, Y. Y., SATO, E., TOYOTA, K. 2011. A multiplex real-time PCR assay for the simultaneous quantification of the major plant-parasitic nematodes in Japan. *Nematology*. 13:713-720.
- 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.
- MacMillan, K., Blok, V., Young, I., Crawford, J. & Wilson, M.J. 2006. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time PCR. *International Journal for Parasitology* 36, 1453-1461.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., Chiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4715-4724.
- Min, Y. Y., Toyota, K., Sato, E. 2012. A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology*. 14: 265-276.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 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.
- Omer, Z., Wallenhammar, A-C., Andersson, S., Viketoft, M. 2017. Säker detektion av rotgallnematoder med LAMP-metod. Slutrapport för Tillväxtfondens projekt nr: 2016/175.
- Sato, E., Goto, K., Min, Yu Yu., Toyota, Koki and Suzuki. C. 2010. Quantitative detection of *Pratylenchus penetrans* from soil by using soil compaction and real-time PCR. *Nematological Research*. 40, 1-6.

- Seinhorst, J.W. 1964. Methods for the extraction of Heterodera cysts from not previously dried soil. *Nematologica* 10:87-94.
- Tanase, A-M., Mereuta, I., Chiciudean, I., Ionescu, R., Milea, L., Cornea, C. P., Vassu, T., Stoica, I. 2015. Comparison of total DNA extraction methods for microbial community from polluted soil. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 6: 616-622.
- Tani, H., Teramura, T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T., Noda, N. 2007. Technique for Quantitative Detection of Specific DNA Sequences Using Alternately Binding Quenching Probe Competitive Assay Combined with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Anal. Chem.* 79: 5608–5613.
- Tebbe, C.C and Vajhen, W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 2657-2665.
- Waite, I.S., O'Donnell, A.G., Harrison, A., Davies, J.T. & Colvan, S.R. 2003. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1165-1173.
- 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.
- Wang, D., Brewster, J., Paul, M., Tomasula, P. 2015. Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Molecules*. 20: 6048-6059.
- Yankson, K.K., Steck, T.R. 2009. Strategy for extracting DNA from clay soil and detecting a specific target sequence via selective enrichment and Real-Time (quantitative) PCR amplification. *Applied Environmental Microbiology*. 75: 6017–6021.
- Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N., Veal, D. A. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*. 1: 40-46.