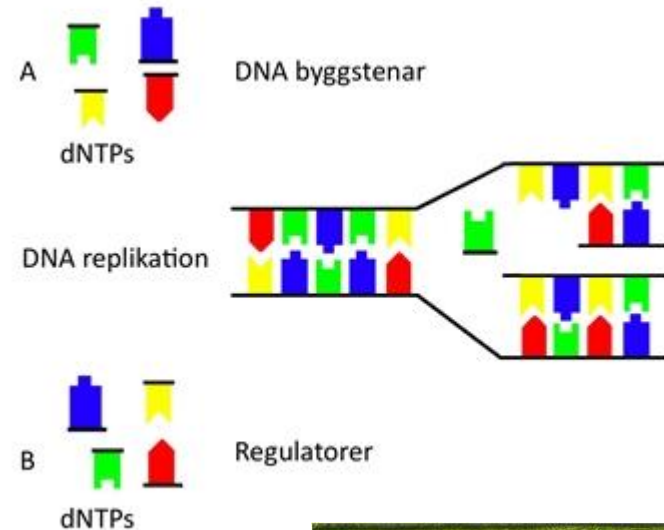


Användning av PCR i växtodlingen

Anders Jonsson, SLU/ JTI, Skara

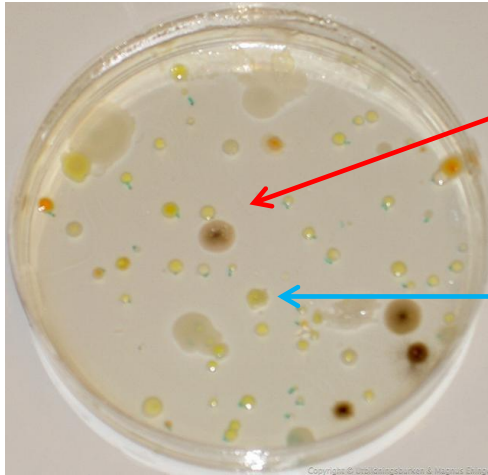


Innehåll

- **Introduktion – qPCR och andra DNA-metoder**
- **Biologisk markkartering av jordburna patogener**
- **DNA-baserade diagnos av bladfläckar på vete**
- **qPCR-metoder för studier av rotdjup**
- **DNA-baserad detektion av åkersniglar?**



Detektion och identifiering av mikroorganismer i växt och jord



Klassisk identifiering

Utseende hos koloni, färg, lukt, N och C-källor.....



DNA-baserad identifiering

- Renodling
 - Extraktion av DNA
 - Sekvensering av DNA
- identifiering av art-specifika DNA-sekvenser

Klassisk mikrobiologi



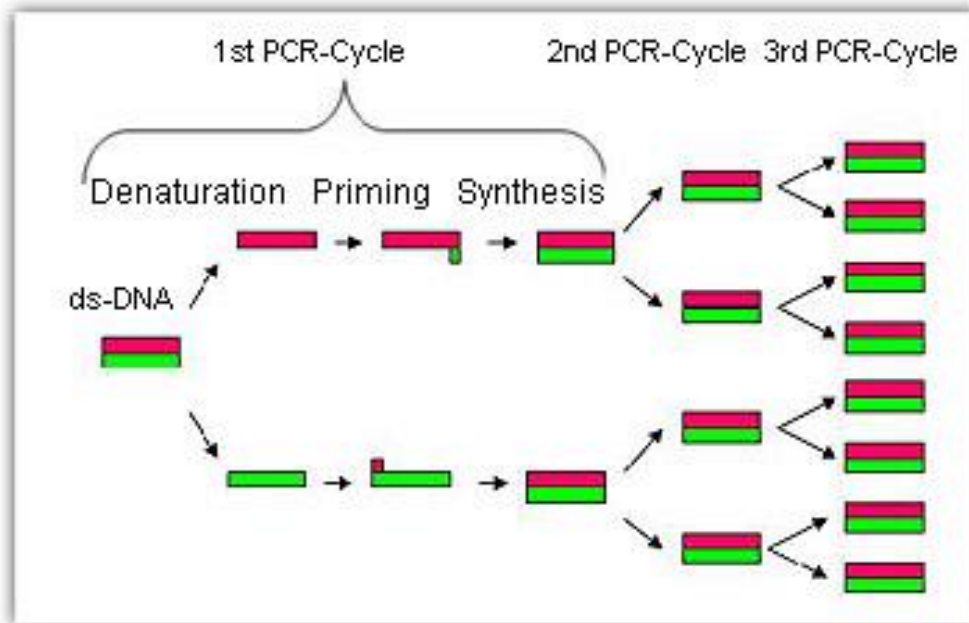
Detektion och identifiering direkt ur växt och jord

*Extraktion av DNA ur jord

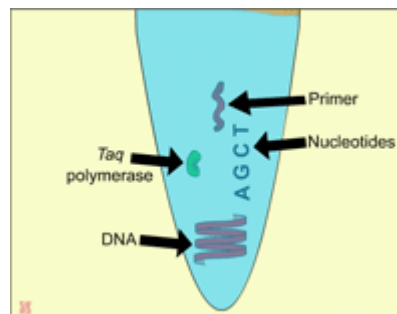
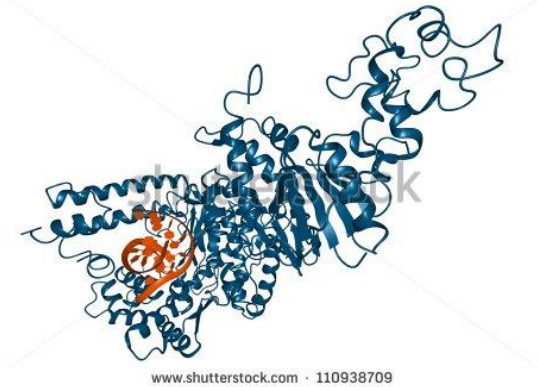
Alt 1. PCR-metodik med artspecifika DNA-sekvenser sk. primers och probe.

Alt 2. Sekvensering av "all" DNA efter "uppförökning" med PCR-teknik av DNA specifikt för olika organismer grupper (bakterier, svamp m. m)

Polymerase Chain Reaction (PCR)



PCR-enzym (värmestabilt)



Thermocycler



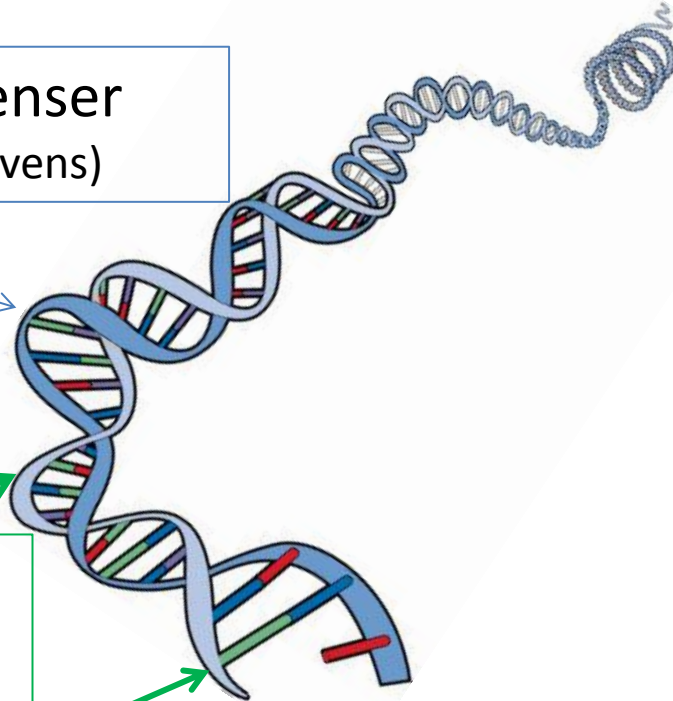
DNA-sekvensering för mikroflora studier

Identifiera specifika DNA-sekvenser

- primers (grupp/ familj/ art specifik sekvens)

Sekvensering (454 mfl)

Bestämning av större eller mindre delar av hela genomets DNA-sekvens

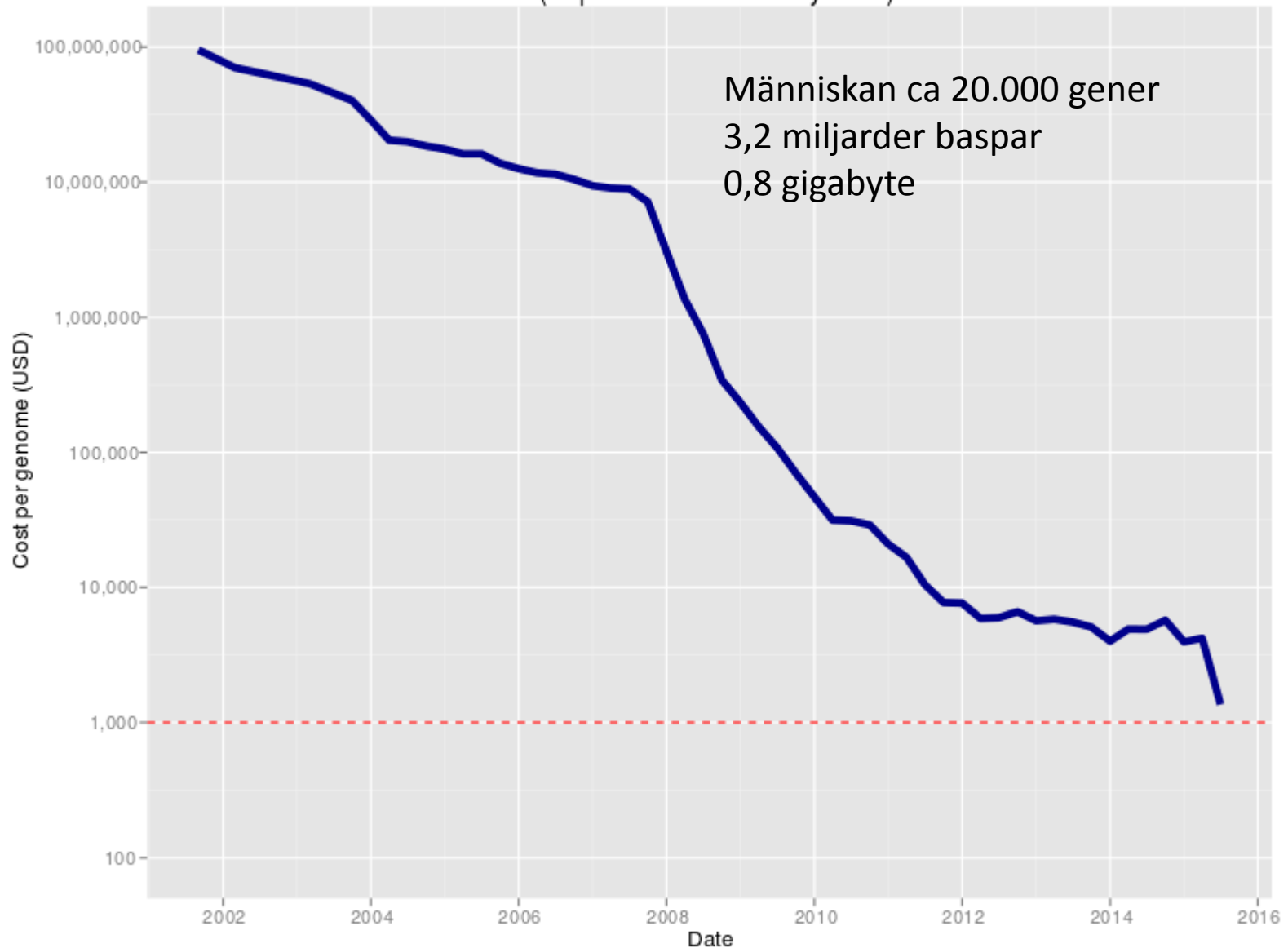


Exempel:

Diversity of Wheat Phyllosphere Fungi in Different Agricultural Production Systems
Ida Karlsson, VPE, SLU

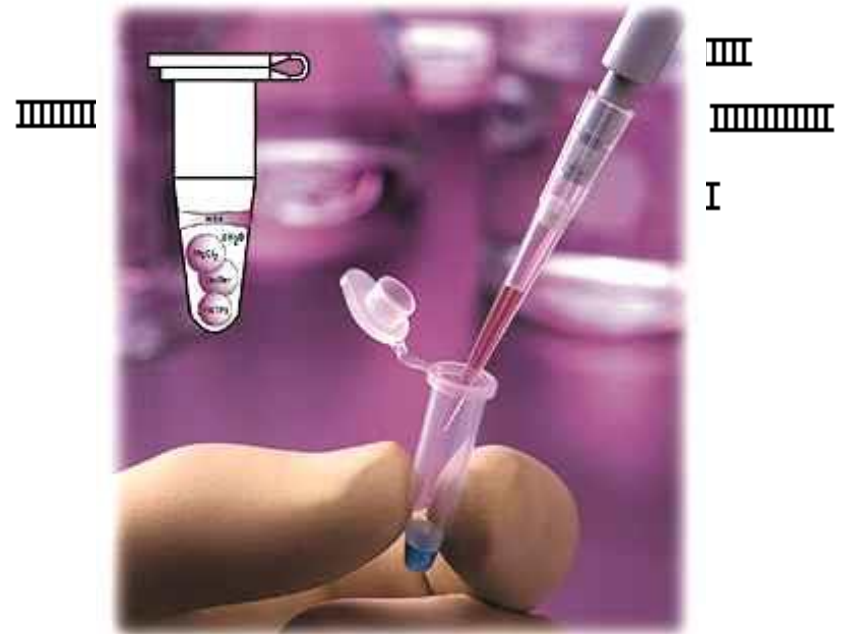
Kostnad för sekvensering av hela det humana-genomet

Cost to sequence a human genome as estimated by NHGRI
(September 2001 to July 2015)



PCR (Polymerase Chain Reaction)

- PCR – polymerase chain reaction
- Kopiera specifika DNA-sekvenser
- Cykler med tre temperatursteg
- Taq polymeras – enzymet som gör jobbet



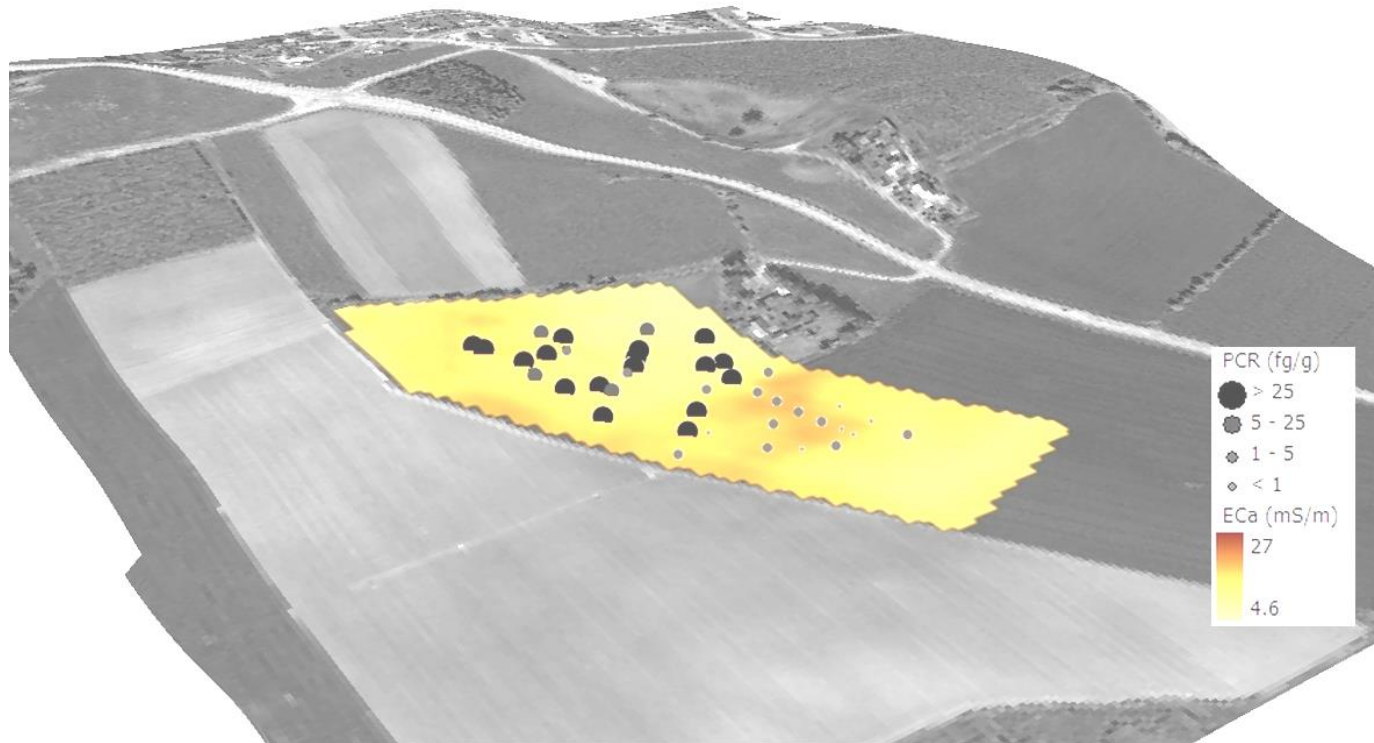
Kvantitativ-PCR (qPCR)

- Kopieringen kan följas i realtid vid varje cykel
 - Fluorescerande färg
 - Fluorescerande prob
- Gör det möjligt att kvantifiera
- Mindre arbetskrävande, snabbare och känsligare



Biologisk markkartering av patogener

- ett TEMA-program vid NJ-fakulteten SLU 2009-2015



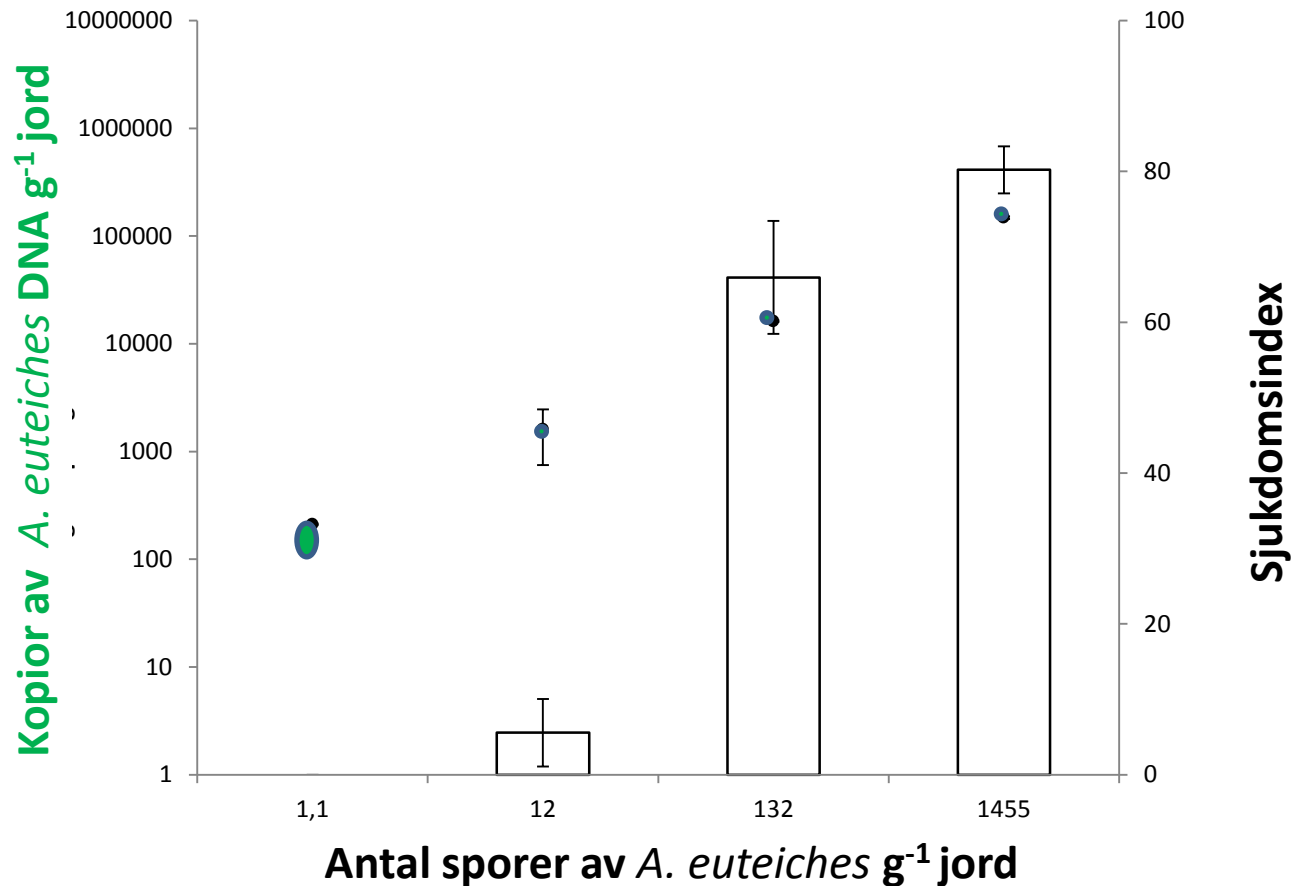
Anders Jonsson mfl...

Avdelningen för precisionsodling och pedometri
Institutionen för mark och miljö, SLU, Skara

Utvecklingen av PCR-metod för DNA från *Aphanomyces euteiches*



Samband mellan antal sporer – sjukdomsindex och DNA kopior

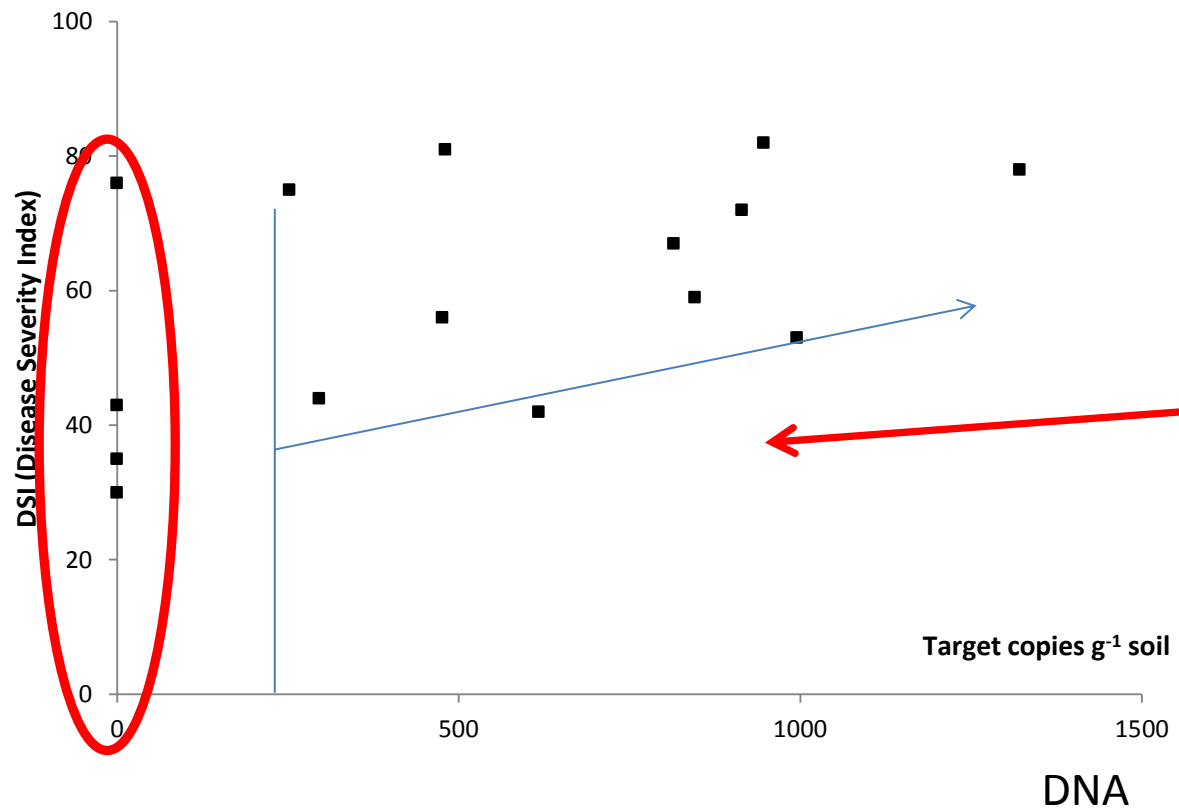


OBS!

- tillsatta sporer
- 10 sporer approx 1500 DNA kopior

Heyman et al.

DNA från *A. euteiches* och sjukdomsindex från 15 olika svenska gårdar



Sammanfattning

- Det finns specifik DNA-metod för att kvantifiera organismen som orsakar ärtrotröta
- I biotester med tillsatta sporer detekteras ca 10 sporer vid lågt index (20-30)
- Problem med sk falska negativa prov. Dvs ingen detektion av DNA från A.e i jord med höga biotestvärden ($DSI > 50-60$)
- **"Inga falska" positiva! Dvs analysen kan användas för att testa fält och avråda vid förekomst!!**
- Fortsatt metodutveckling för att förbättra extraktionen av DNA från jord nödvändig för att helt kunna "frikalla fält"

Utveckling av verktyg för fältanpassad riskbedömning för infektion av bomullsmögel i vårrops

Ann-Charlotte Wallenhammar och Charlotta Almquist

I



Askosporer sprids under optimala ljus och fuktförhållanden från apotecier som gror från sklerotier i jorden.



Allmänna uppfattningen är att infektionen i plantan sker när askospor infekterade kronblad fastnar på bladen (Jamaux *et al*, 1995).

Utveckling av verktyg för att bestämma växt- och luftburen smitta med qPCR



Kronblad

2006-2011



Blad

2008-2012



Luftprover

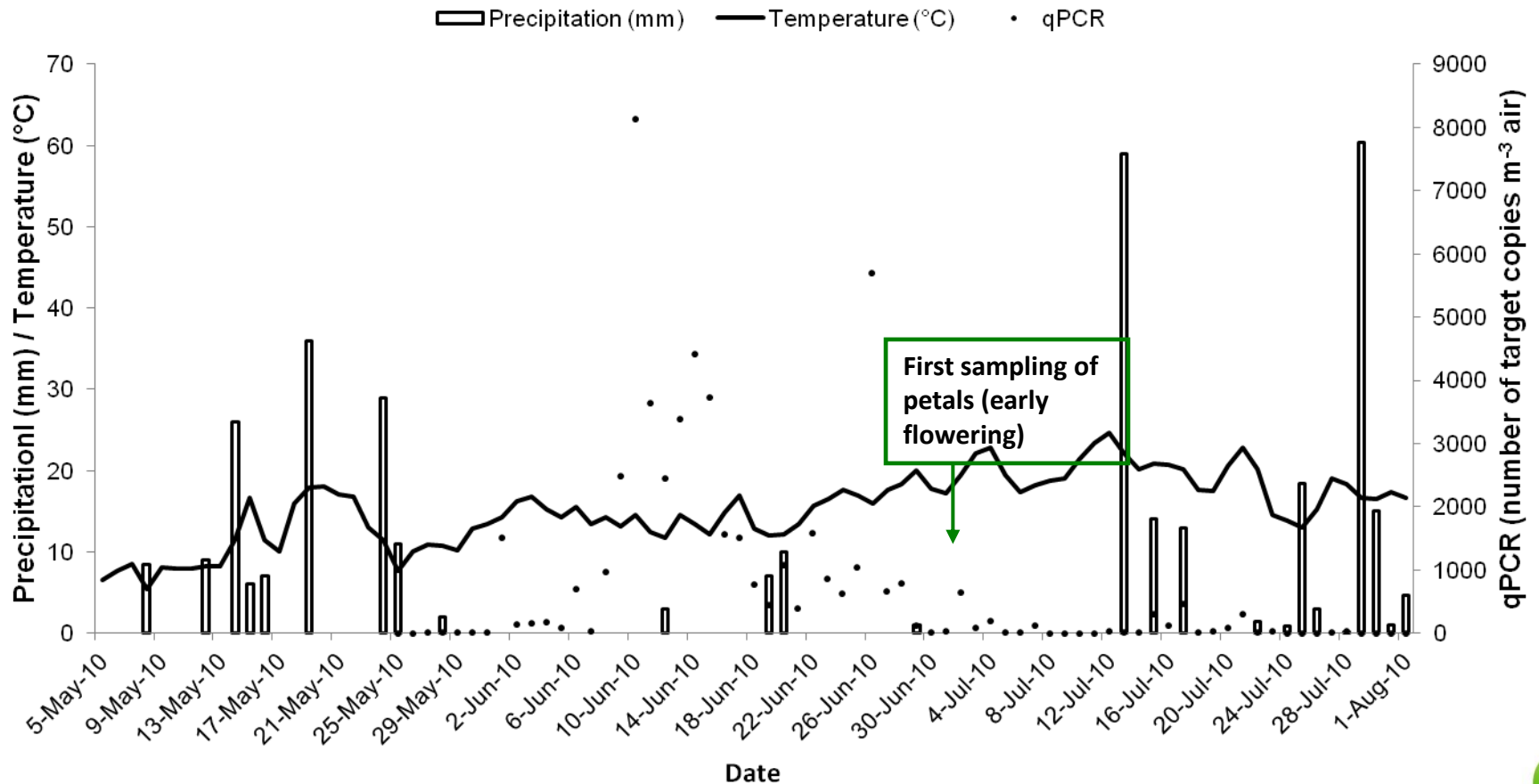
2009-2012

Förekomst av *Sclerotinia sclerotiorum* DNA på kronblad och blad i fältförsök i Örebro län 2010

Försöks- plats	Datum	Bladnivå				
		Kron- blad	1	3	5	7
A. Hidingsta	21 juni	35a	42ax ¹	42ax	71xa	67ax
	28 juni	3b	33 ay	50ay	83axy	92ax
	2 juli	8b	25ay	75ay	100ax	100ax
	6 juli	0b	17ay	50ay	89ax	e.a.
B. Åkerby	30 juni	0a	17ax	25ax	67ax	100ax
	5 juli	0a	17ax	8ax	17abx	e.a.
	9 juli	0a	0ax	0ax	8bx	22ax
	12 juli	0a	0ax	8ax	22abx	e.a.
	14 juli	0a	0ax	16ax	0 bx	e.a.

Olika bokstäver indikerar statistiskt signifikanta skillnader mellan provtagningsdatum inom varje fältförsök (ab) och mellan bladnivåer inom varje fältförsök (xy) . E.a. indikerar ej analyserade prover.

Förändring i mängd luftburen *S. sclerotiorum* DNA 2010



Detektion av bladpatogener i vete med qPCR

Anders Jonsson , Charlotta Almquist och Cecilia Lerenius

???



Problem vid gradering....

- **Största variationen vid låga angrepp – låg repeterbarhet**
- **Överskattar låga angrepp (<10% av bladytan)**
- **Signifikanta skillnader i avläsning hos olika observatörer**
 - **dvs vi skattar svampangreppen olika**
- **Exempel på stor variation vid praktisk avläsning och
och det dras helt felaktiga slutsatser**
 - Mkt svårt att skatta angrepp av mjöldagg och brunrost

Vilken patogen är det?

Hur stora angrepp?



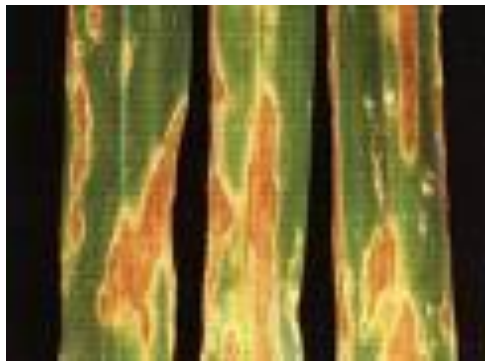
Hur stora är angreppen?

Vilka patogener !

Septoria nodorum

Septoria tritici

Drechslera tritici-repentis



Hur många procents
bladyta är angripen?
"Bildanalys!!"



Kvantifiering med PCR

Två sätt att bestämma kvantiteten

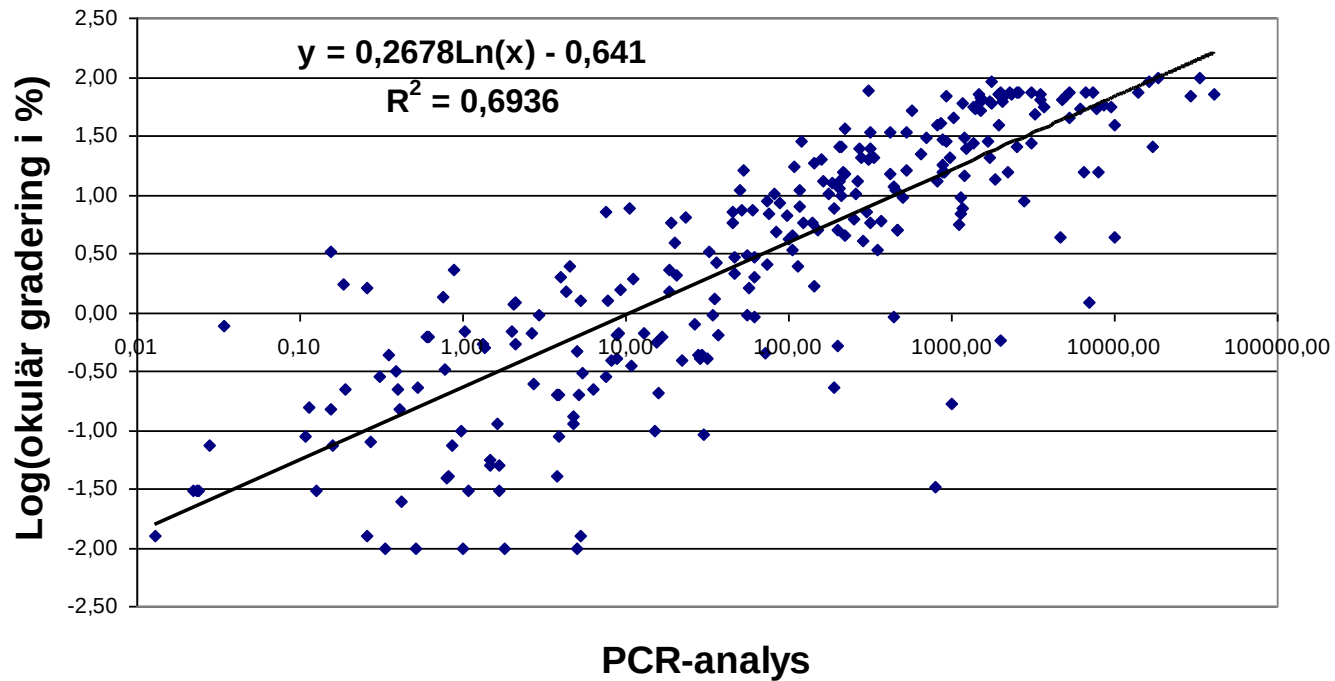
- **Relativ kvantifiering** – mängden av målgenen normaliseras till en annan gen och uttrycks relativt ett kontrollprov
- **Absolut kvantifiering** – mängden av målgenen bestäms med hjälp av en standard

Resultat - Vete

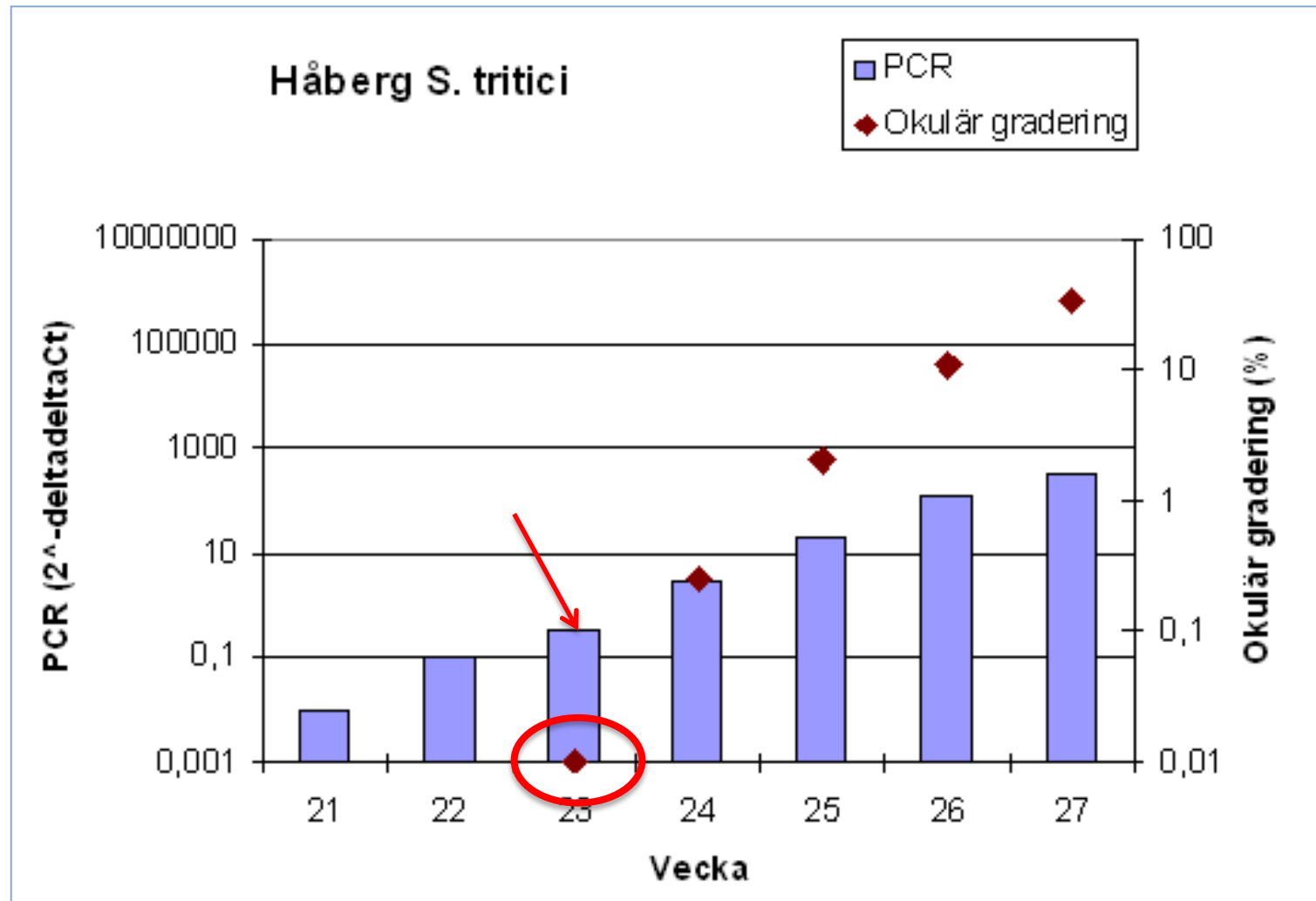
Samband okulär gradering och PCR

S. tritici

Veteprover uttagna 2006 och 2007

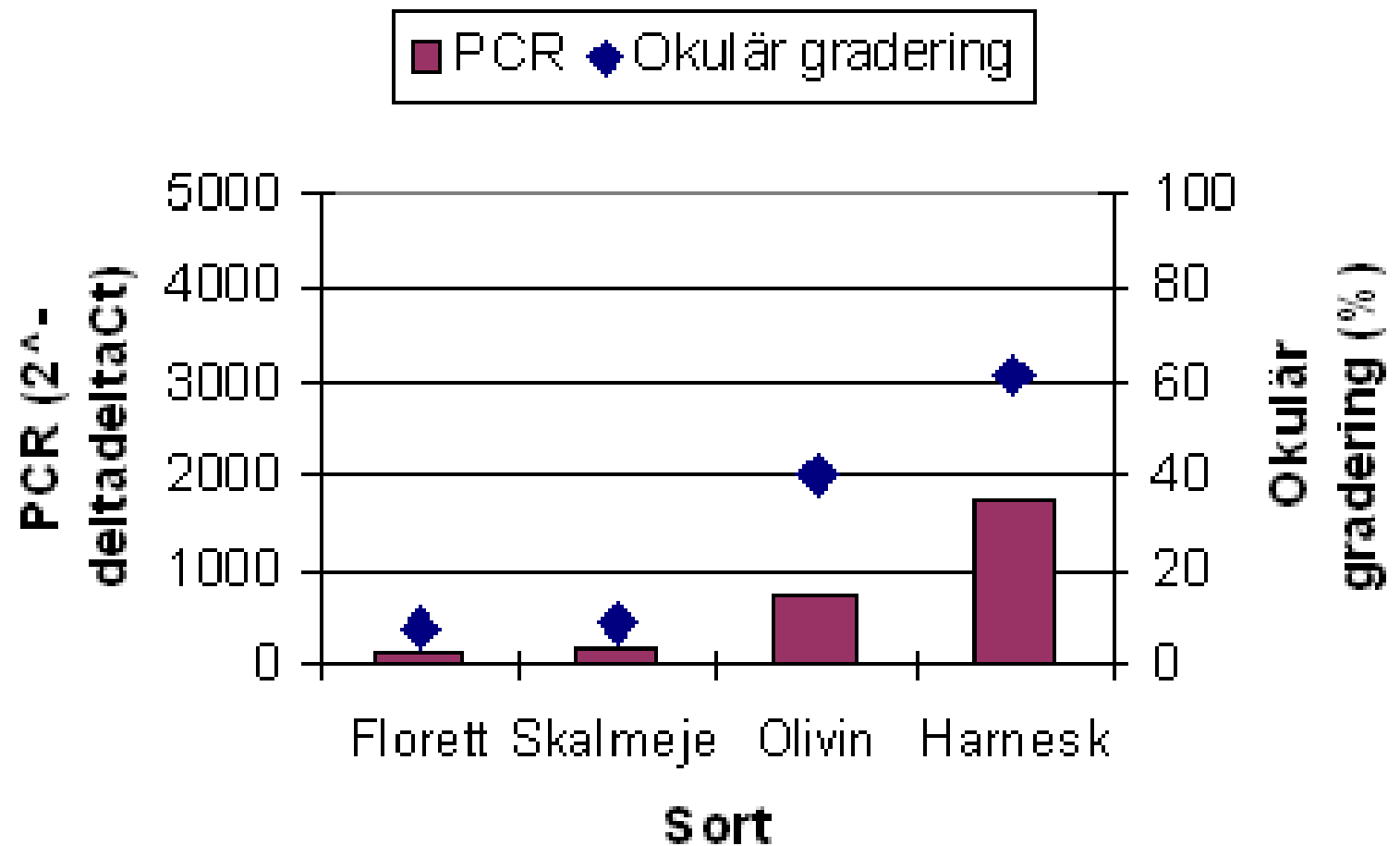


Tidig upptäckt av patogen



Sortförsök

S. tritici Russelbacka bladnivå 2



Dags att lanseras i fält?

- **Kostnad jämfört med traditionell teknik?**
- **PCR-analysen kräver kvalificerat lab,
Vem gör jobbet?**
- **Utveckla presentationen av resultat?**
- **IPM – kräver utveckling av bekämpningströsklar**



Men det dröjer.....nog....2008..

Bestämning av rotdjup med qPCR

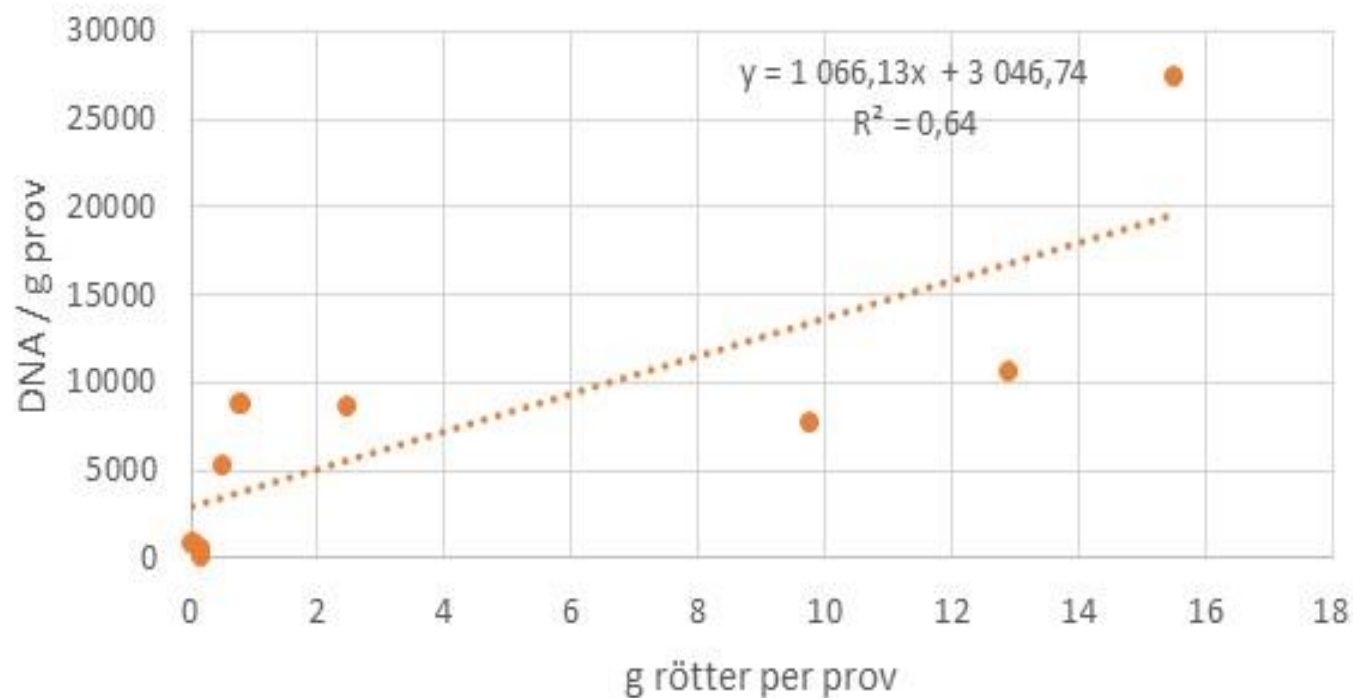
Anders Jonsson & Ulf Axelsson



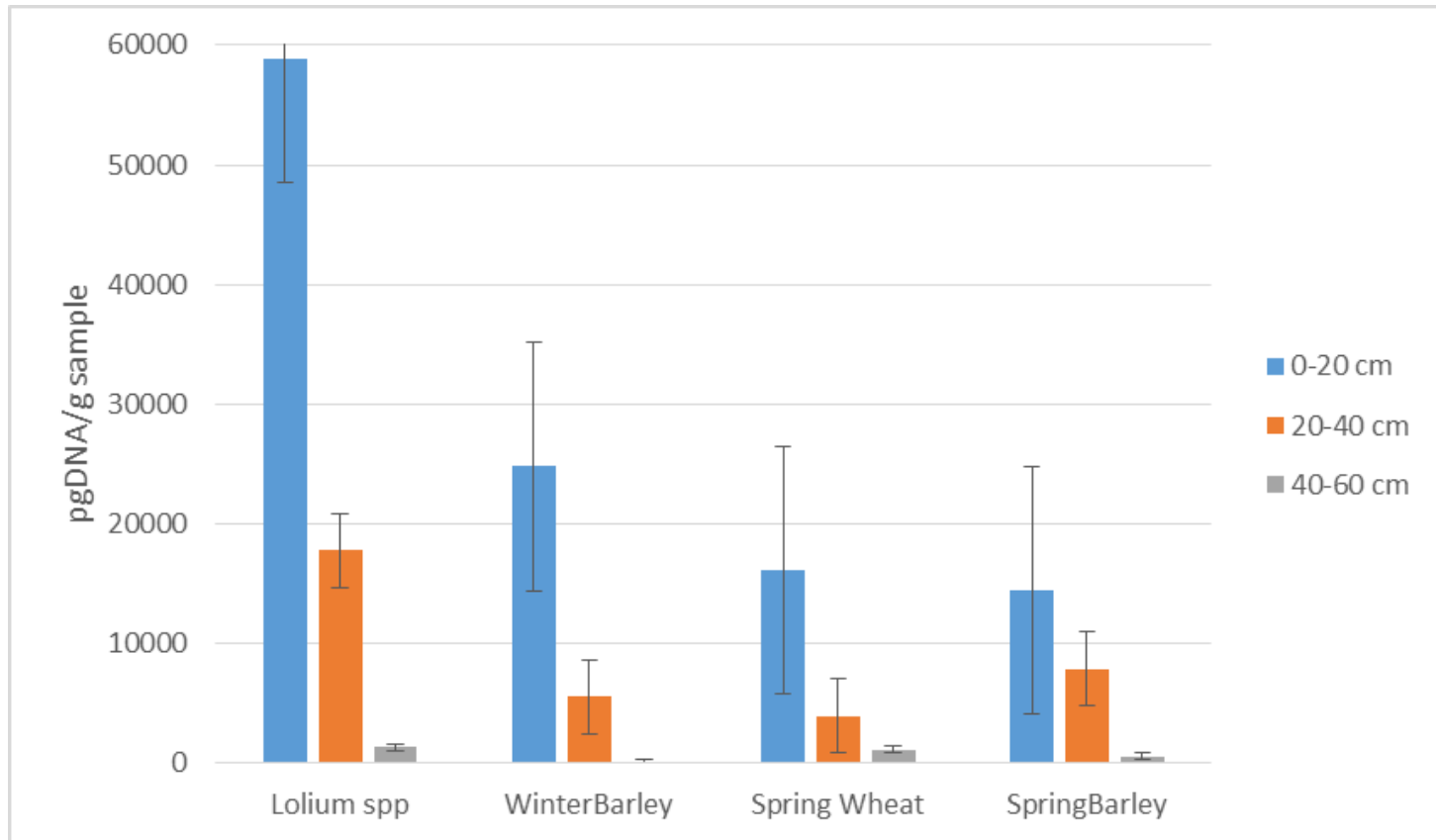
Foto: Väderstad

Kornrötter– qPCR och tvätt

Samband mellan g DNA per prov och g rötter per prov i vårkorn



Rot-DNA från på olika djup bestämt med qPCR





Hushållnings
sällskapet

Kan åkersnigel "räknas" med qPCR?

På G: SLF-ansökan för utveckling av automatisk räkning



Foto: Ulf Axelson HS Skaraborg

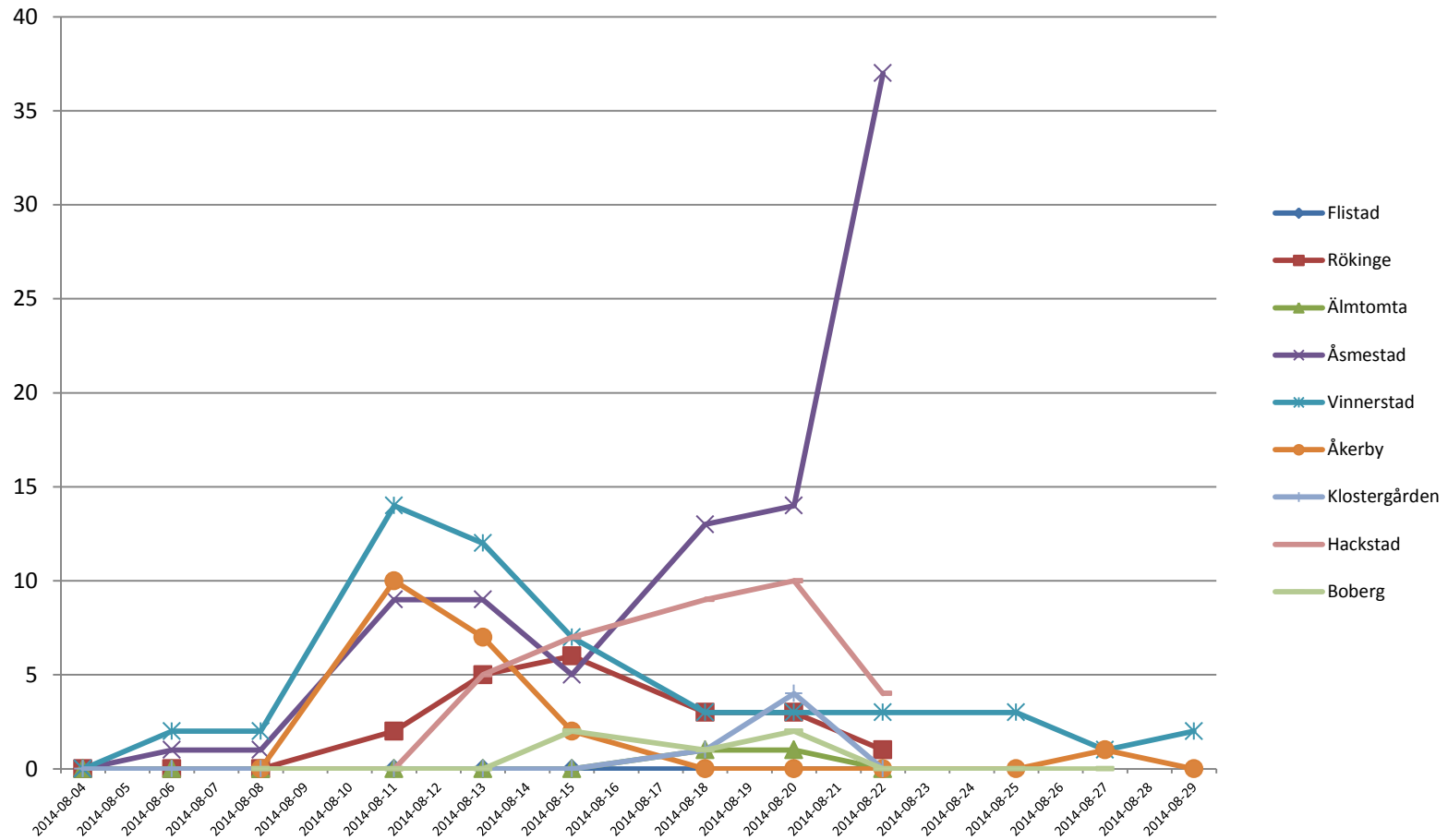


JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik
JTI – Swedish Institute of Agricultural and Environmental Engineering



Hushållnings
sällskapet

Åkersniglar i Östergötland augusti 2014



Data: Ulf Axelson

Detektion av åkersnigel med qPCR?

Tillgång till specifika DNA-sekvenser?

Genebank.....

Sekvensera och söka efter artegna DNA-sekvenser

Design av art-specifika DNA sekvenser som "primers och probe"

Designprogram

Extraktion av DNA ur sniglar.

Problem med DNA- utbytet.... Upprening och förluster

PCR-körning- Utformning av temperaturcykler.....

Jordprovtagning!!

Hur många stick ? Vuxna och ägg?

Malning ? Med mer.....

Användning av qPCR

Praktiskt **idag!**



förekomst av DNA från "klumprotsjuka"

Praktiskt **i morgon?**



: Ärtrotröta , *Verticillium*....., Klöver rötter...
Bomullsmögel, *Phyth. pisi*

- Bestämning av bladfläcksvampar!



-Rotdjup och rotmassa av grödor

-Bestämning av snigelförekomst i fält ??



Tack!

Sponsorer:

*SLF, SLU (NJ-fakulteten),
Lantmännensforskningsstiftelse, AgroVäst ,
Jordbruksverket m fl.....*

Medarbetare:

*Ann-Charlotte Wallenhammar, Ulf Axelson,
Charlota Almquist, Cecilia Lerenius mfl*