

SoildiverAgro project

Toepassing van nieuwe beheerspraktijken om de productie en de kwaliteit van de gewassen te verbeteren



HET PROBLEEM

De moleculaire karakterisering van gemeenschappen van bodemnematoden wordt bemoeilijkt door het ontbreken van een geoptimaliseerde DNA-extractiemethode

De karakterisering van bodem-nematodengemeenschappen bv. ter bepaling van de biodiversiteit, is eenvoudiger, sneller en goedkoper met DNA-methoden, maar voor betrouwbare resultaten is DNA van goede kwaliteit een must. Helaas zijn de meeste DNA-extractiemethoden geoptimaliseerd voor het extraheren van DNA uit geïsoleerde plant-parasiterende nematodenindividuen of voor het detecteren van plant-parasiterende nematodensoorten in een nematodengemeenschap. Alle plant-parasiterende nematoden samen vormen echter slechts ongeveer 15% van alle beschreven nematodensoorten. Om DNA te verkrijgen uit de volledige verscheidenheid aan nematoden die in een bodemmonster aanwezig zijn, moeten de DNA-extractiemethoden gevalideerd en zo nodig geoptimaliseerd of nieuw ontwikkeld worden.



1. Een diverse nematodengemeenschap uit een bodemstaal (ILVO).

HOE WORDT HET PROBLEEM AANGEPAKT?

Een geoptimaliseerde DNA-extractiemethode nematodengemeenschappen

Tijdens het SoildiverAgro-project (H2020 project 817819) werd een nieuw DNA-extractieprotocol ontwikkeld om een kwalitatieve en kwantitatieve betrouwbare karakterisering van een bodemnematodengemeenschap op basis van DNA mogelijk te maken. Het nieuw DNA-extractieprotocol combineert een aanrijks-, filtratie- en bead-beating-methode met een commerciële DNA-extractiekit om optimaal DNA te extraheren uit nematodengemeenschappen van uiteenlopende bodemsoorten en oorsprong. Tijdens de aanrijksmethode worden nematoden door zonale centrifugatie uit de bodem geïsoleerd. Het voordeel is dat veel bodemorganismen die geen nematoden zijn, worden verwijderd, die anders het identificatieproces van de nematoden zouden vernietigen. Bovendien maakt de aanrijksmethode het mogelijk om een grotere hoeveelheid grondmonster (100 ml) te gebruiken in vergelijking met methoden die DNA rechtstreeks uit de grond halen (5-10 g). Vervolgens worden de nematoden in de suspensie verzameld op een filter (0,8 µm PES membraanfilter) via vacuümfiltratie. De vloeibare fase wordt weggegoten, het filter met nematoden wordt in een Eppendorf-buisje van 2 ml gebracht en vernietigd met wolframcarbide-kogels d.m.v. bead-beating. De smurrie wordt daarna volledig gebruikt voor DNA-extractie. Deze stappen concentreren de nematodensuspensie tot een volume geschikt voor commerciële DNA-extractiekits. Tevens worden de nematoden vernietigd te voordele van een efficiëntere DNA-extractie. De toegepaste commerciële DNeasy Powerlyzer Powersoil DNA-extractiekit (Qiagen) bevat (i) een chemische lyse-stap om cellen te vernietigen en (ii)

help bij het karakteriseren van bodem-

meerdere zuiveringsstappen om chemische stoffen in de bodem te verwijderen. Het resultaat is zuiver DNA van goede kwaliteit. Testen toonden aan dat deze DNA-extractiemethode efficiënter en gevoeliger is dan eerdere protocollen.



2. De AZC (Geautomatiseerde Zonale Centrifuge) is gespecialiseerd om tot 95% van alle aanwezige nematoden in een grondstaal (100 ml) te verzamelen in een kleine beker (40 ml nematoden suspensie).

3. Vacuüm-filtratie apparaat met (van boven naar beneden) een suspensie reservoir, een klem, een filter houder, een rubberen stop en een Erlenmeyer fles met uitlaat.



KERNWOORDEN

DNA-extractie, moleculair karakteriseren, bodem, vacuümfiltratie, nematodengemeenschappen, zonale centrifugatie

AUTEURSCHAP

Lieven Waeyenberge, Instituut voor Landbouw-, Visserij- en Voedingsonderzoek (ILVO) Merelbeke, België.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 817819

This factsheet is produced as part of the SoildiverAgro project. Although the author has worked on the best information available, neither the author nor the EU shall in any event be liable for any loss, damage or injury incurred directly or indirectly in relation to the project.