

Stinksot – molekylär detektionsmetod

Anna Berlin

Inst. Skoglig mykologi och växtpatologi, Uppsala

Stinksot

Svampsjukdom som angriper ax och kärnor, kärnorna ersätts av sotsporer

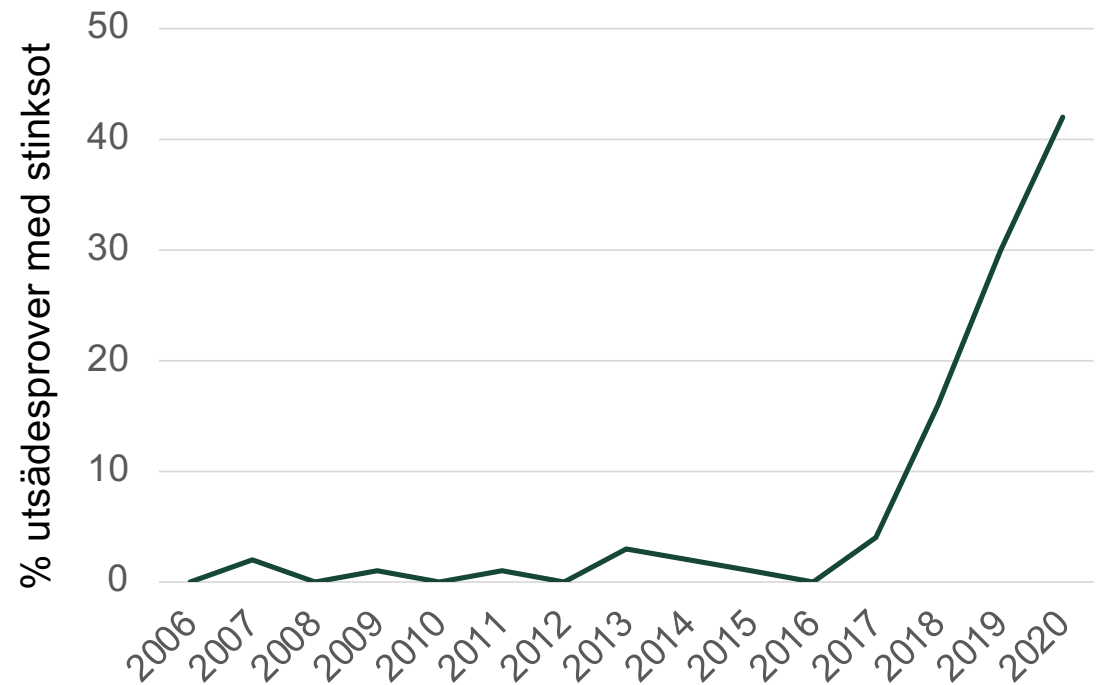
Karakteristisk lukt, angripna kärnor avger en stark lukt av rutten fisk-lukt

Smittar främst via utsäde, kan orsaka stora kvalitets- och skördeförluster om inte betning används



Stinksot

- Ökad förekomst i ekologisk odling
- Ibland osäker detektion
- Flera arter?



% analyserade utsädesprover genomförda av Utsädesenheten vid Jordbruksverket i vilka stinksot hittats mellan 2006 och 2020 (Alf Djurberg, Jordbruksverket)

Varför stinksot har ökat?

1. Undersöka sjukdomens utbredning och biologi i Sverige
2. Undersöka vetesorter för resistens mot stinksot för att ta reda på vilka resistensgener som är effektiva mot de raser som är vanliga i Sverige
3. **Uppdaterad metod för detektion av stinksot i utsäde**



Foto: T. Bengtsson

Flera tillgängliga metoder – otydliga resultat



Free Access

Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed

[M. McNeil](#), [A.M.I. Roberts](#), [V. Cockerell](#), [V. Mulholland](#)

First published: 14 December 2004 | <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01094.x> |

VIEW METRICS

Development of real-time PCR and droplet digital PCR based marker for the detection of *Tilletia caries* inciting common bunt of wheat

 Zhaoyu Ren¹  Rongzhen Chen^{1,2}  Ghulam Muhae-Ud-Din¹  Mingke Fang^{1,3}  Tianya Li²
 Yazheng Yang³  Wanquan Chen¹  Li Gao^{1*}

¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

² Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Liaoning, China

³ College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, China

Journal of Phytopathology

Journal of Phytopathology homepage

Full Access

Detection of *Tilletia caries*, Causal Agent of Common Bunt of Wheat, by ELISA and PCR

[P. Eibel](#), ¹ [G. A. Wolf](#), ² [E. Koch](#) ¹

First published: 13 May 2005 | <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00973.x> |

VIEW METRICS

Applied Microbiology and Biotechnology (2022) 106:1257–1278
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11757-2>

GENOMICS, TRANSCRIPTOMICS, PROTEOMICS



Discrimination of *Tilletia controversa* from the *T. caries*/*T. laevis* complex by MALDI-TOF MS analysis of teliospores

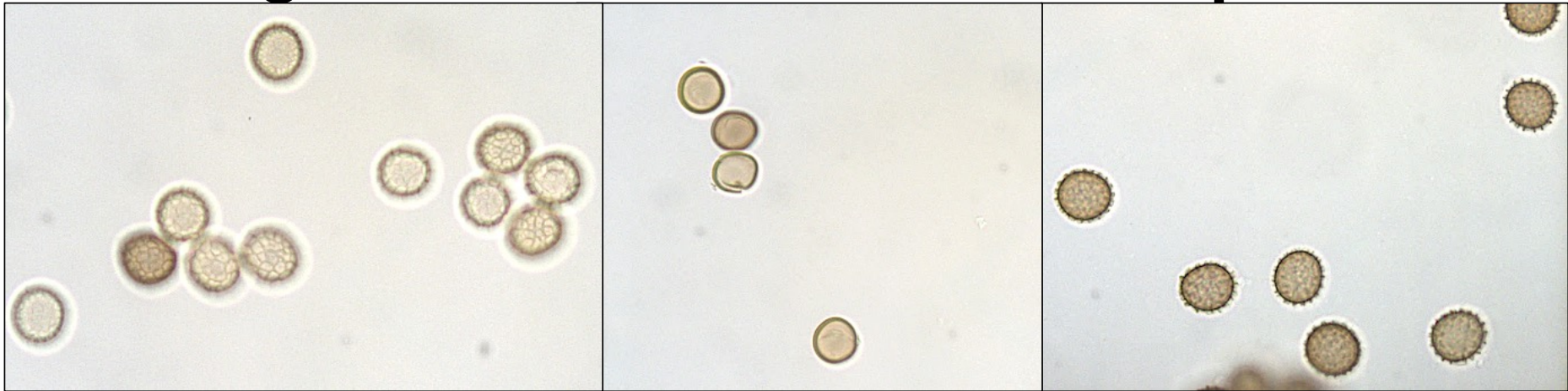
Monika K. Forster^{1,2} · Somayyeh Sedaghatjoo^{3,4} · Wolfgang Maier³ · Berta Killermann¹ · Ludwig Niessen² 

Syfte:

Att utveckla och testa
en snabbare och mer
tillförlitlig detektion av
stinksot i utsäde



Morfologiska skillnader inom artkomplexet



Tilletia controversa

Tilletia leavis

Tilletia caries

dvärgstinksot

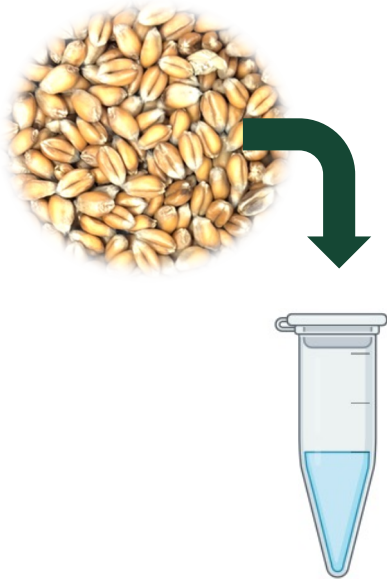
stinksot

Genetiskt är *T. leavis* och *T. caries* är samma art!

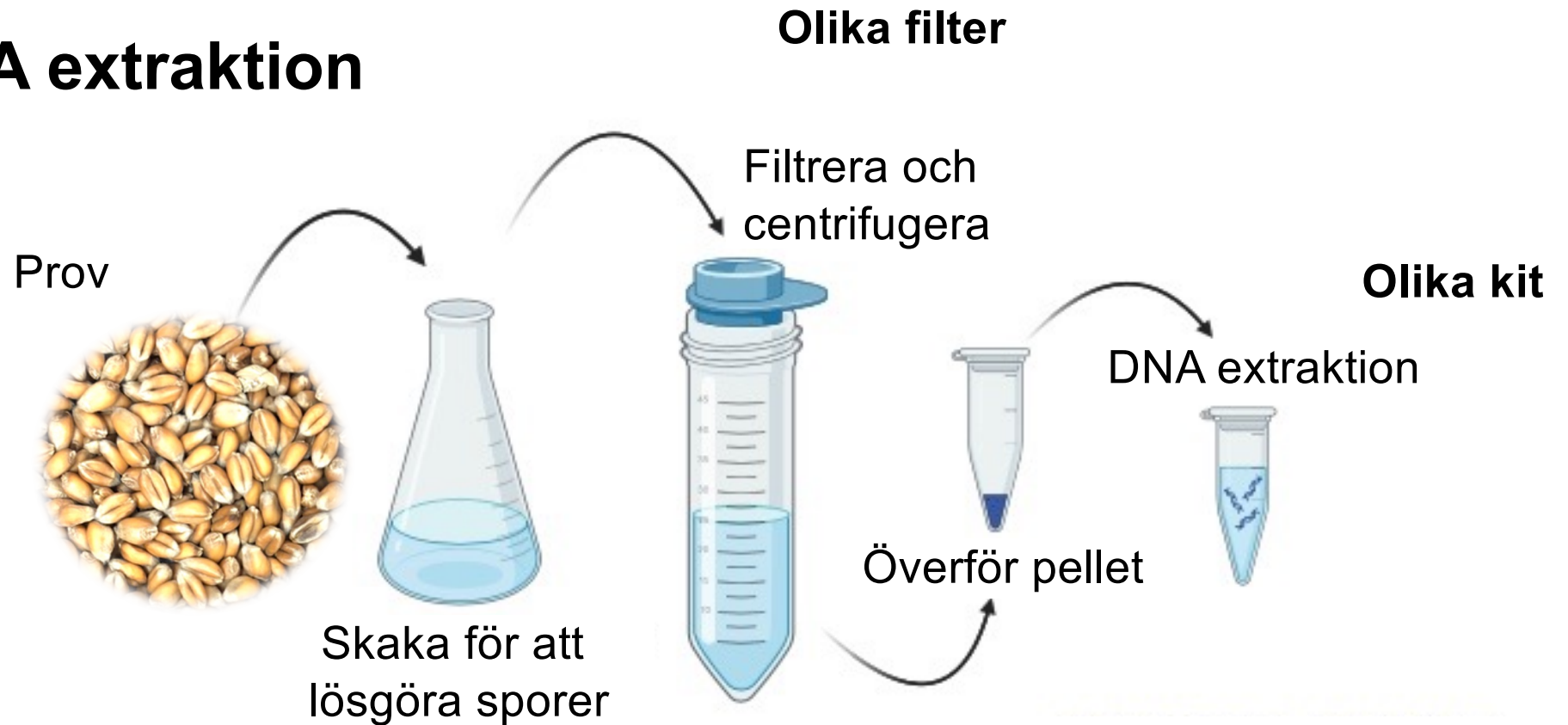
Foto: Magda Karlo, SLU

Utveckling av PCR-baserad detektionsmetod

**1. DNA
extraktion**



DNA extraktion



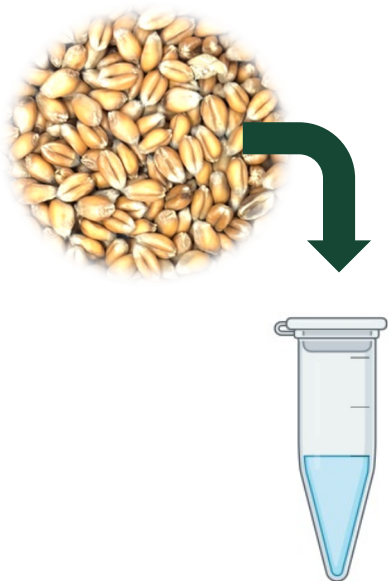
Olika mängder provmaterial

Utveckling av PCR-baserad detektionsmetod

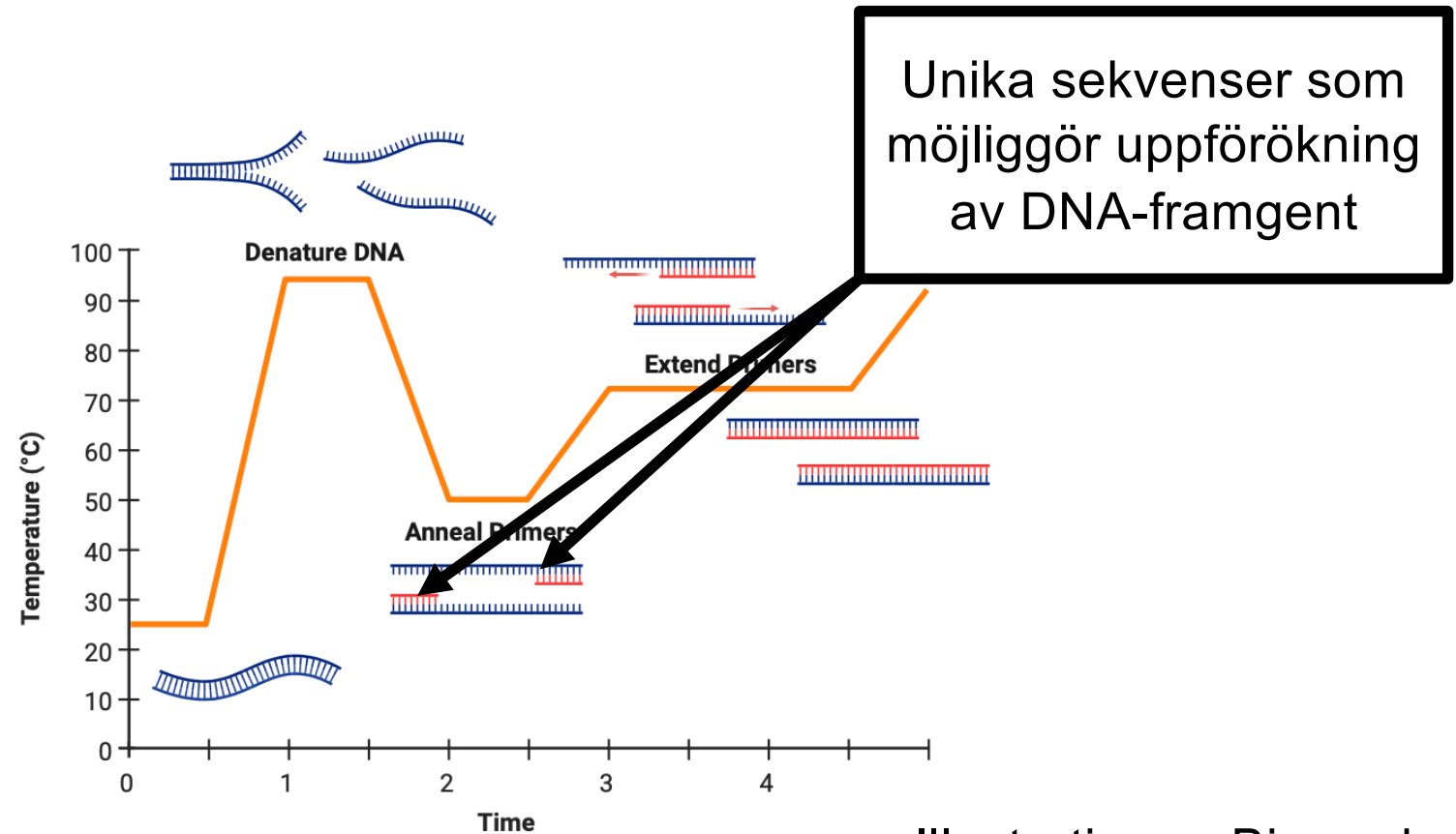
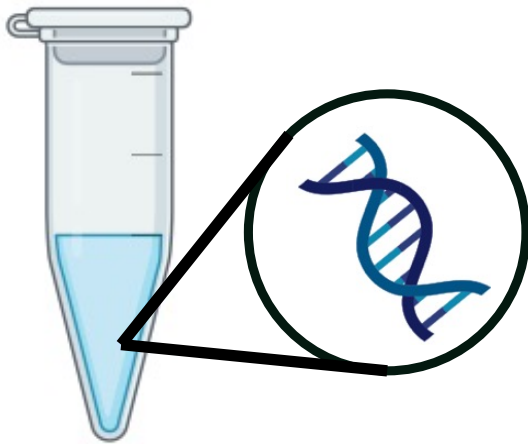
**1. DNA
extraktion**

2. dPCR

Primrar



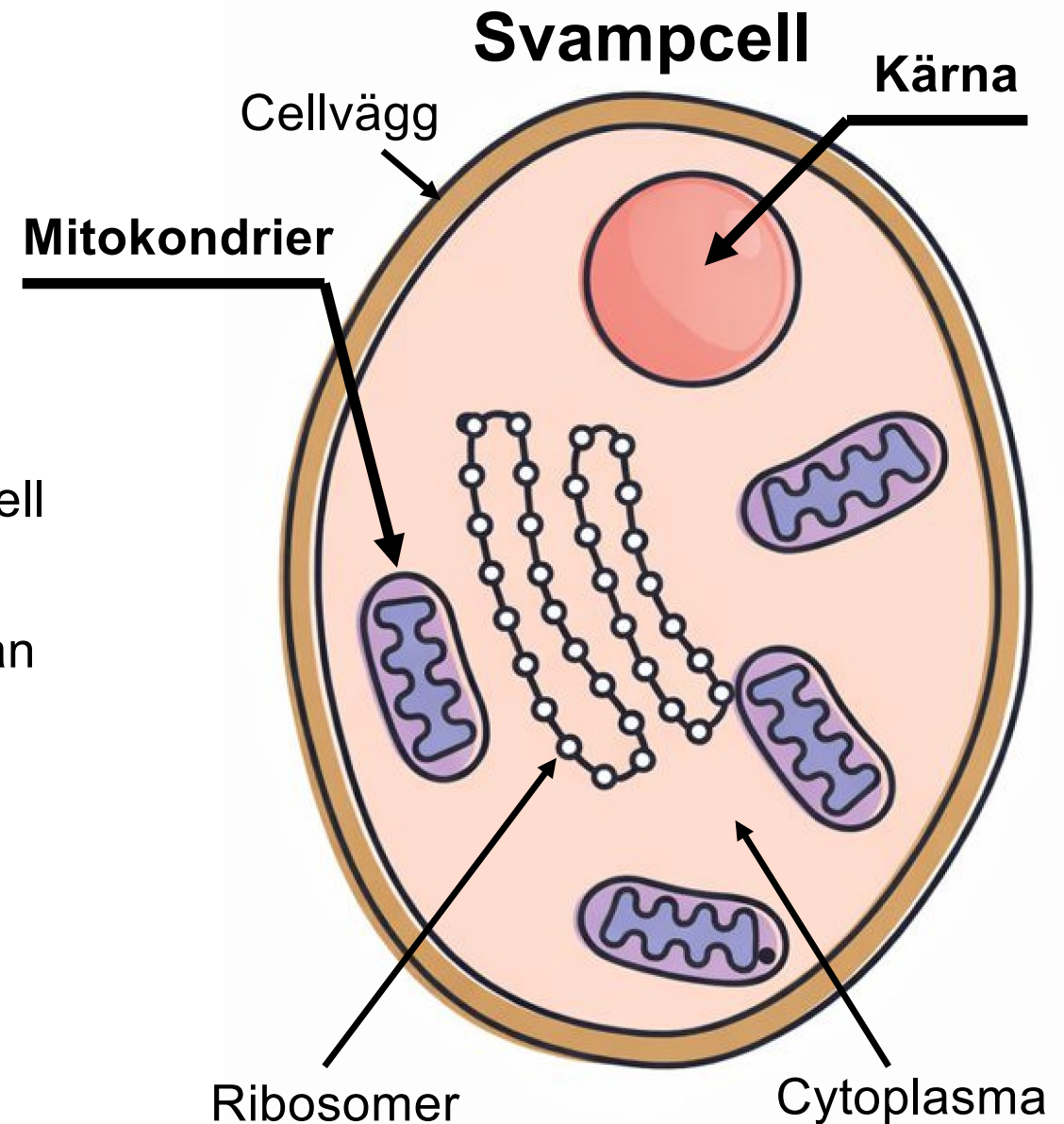
Utveckling av primrar för PCR



Illustrationer: Biorender

Utveckling av primrar

- **Kärn-DNA**
specifikt och känt antal kopior per cell
- **Mitokondrie DNA (mtDNA)**
hög känslighet, variabelt antal mellan celler



Digital PCR (dPCR)

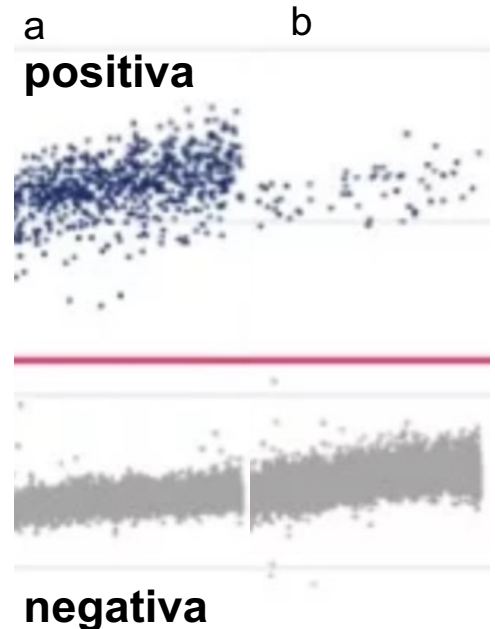
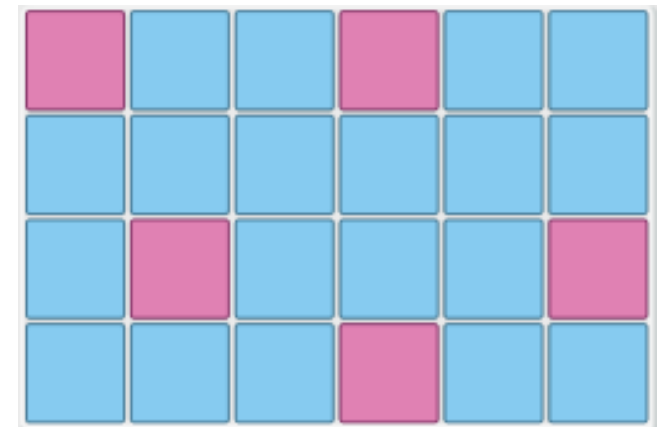
1. Provet delas i många små volymer i mikrokammare

2. PCR körs i varje mikrokammare

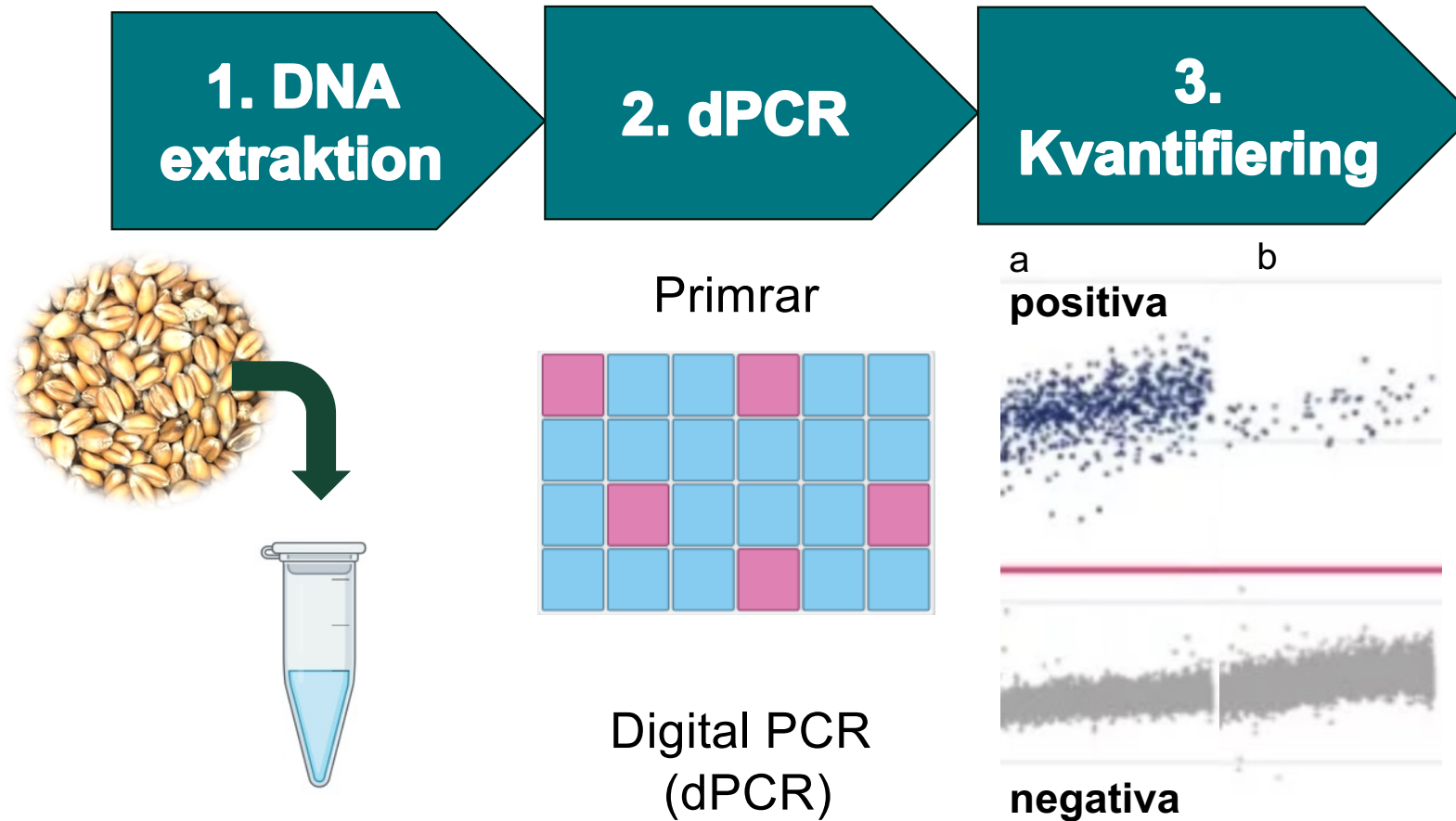
Varje kammare blir:

- positiv (fluorescens) → mål-DNA finns
- negativ → inget mål-DNA

3. Andelen positiva PCR-reaktioner används för att räkna ut **absolut antal kopior** i ursprungsprovet.

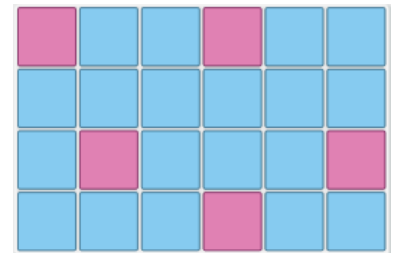


Utveckling av PCR-baserad detektionsmetod



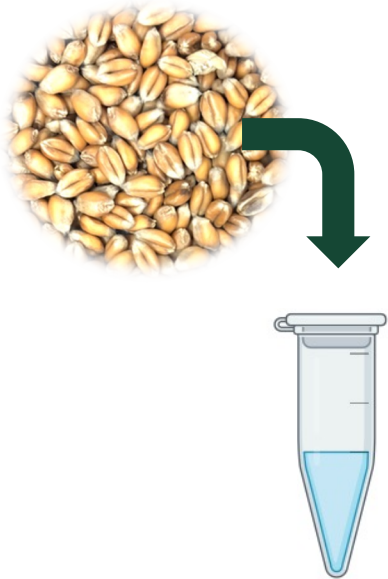
Hur förhåller sig dPCR resultatet till mikroskopmetoden?

- Blind-prover från Jordbruksverkets utsädesenhet och Mellansvenska Frökontrollen AB
- Antal sporer räknades med mikroskopmetoden
- dPCR analys för både kärn-DNA och mtDNA



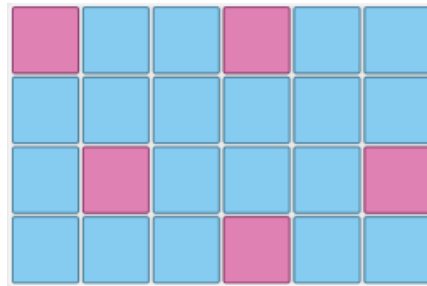
Utveckling av PCR-baserad detektionsmetod

**1. DNA
extraktion**



2. dPCR

Primrar



Digital PCR
(dPCR)

**3.
Kvantifiering**



4. Certifiering

ISTA- protokoll?



Sammanfattningsvis

- *T. caries* och *T. leavis* är samma art trots olika utseende på sporerna
- Molekylär detektion fungerar, men beroende på val av primrar är den mindre känslig än mikroskopmetoden
- Molekylär detektion något snabbare
- Molekylär detektion – samma instrument kan användas för olika analyser





Tack till

SLU, Alnarp

Therese Bengtsson
Lizel Poltgiter
Matilda Ericson
Magda Karlo
Lauréne Mailhan

Hush

Eva Edin

Agroscope

Cecilia Panzetti
Karen Sullam

SLU, Ultuna

Katarina Ihrmark
Björn Andersson



Hushållnings
sällskapet



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Material

ALLKORN

Ekologiska lantbrukarna

Mellansvenska Frökontrollen AB

Utsädesenheten



Finansiering



Stiftelsen
Lantbruksforskning

