

---

## Poster

### Nematologie

---

#### 167 - Swiss NEMA-BOL: Barcoding von Nematoden in der Schweiz – Proof of Concept

*Swiss NEMA-BOL: Barcoding of Swiss Soil Nematodes – a Proof of Concept*

**Sebastian Kiewnick, Jürg-Ernst Frey**

Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, Schloss 1, Postfach, 8820 Wädenswil, Schweiz, sebastian.kiewnick@agroscope.admin.ch

Barcoding has grown into an important tool for reliable taxon identification and for research in biodiversity and molecular ecology. A detailed analysis of nematode assemblages and biodiversity at the species level provides a solid basis for developing specific nematode bioindicators that enable identification of anthropogenic stress factors for soil health. This project aims at establishing baseline data originating from a single field site to demonstrate a proof-of-concept. These data will then be used for a follow-up project to barcode Swiss soil nematodes across representative soil types from regions in Switzerland representing different soil ecosystems.

For this project we aim at i) analysing the nematode diversity in a soil with a high species diversity, obtained from an organic farm in Switzerland, at the species level, and ii) establishing the SSU rDNA and mitochondrial COI barcode sequence for the most abundant species.

Soil samples were obtained in Spring 2014 from an organic farm near Wauwil, CH. The nematode suspensions obtained using standard extraction procedures, containing thousands of specimen, were split into two subsamples. From the first half 300 specimen were selected and high-resolution multifocal images were generated as a digital voucher followed by DNA extraction using a lysis buffer protocol (Holterman et al., 2009). From the second half of the suspension, subsamples of approx. 5000 specimen, total nematode DNA was extracted using a lysis buffer protocol according to Porazinska et al. (2009).

For the DNA obtained from individual specimen, Sanger sequencing will be utilized for the amplified SSU and COI regions of each individual. Species allocation of the established COI sequence will be made by comparison of the SSU sequence of the same individual to a database composed of a collection of >2400 full length SSU rDNA sequences across the phylum (Van Megen et al. 2009).

For the complex DNA sample, 454 pyrosequencing technology (GS Junior sequencer) is used to perform SSU rDNA amplicon sequencing that will enable to identify all nematodes species or genera which occur at a frequency of above 0.1% in this respective sample. Sequence data will be analysed as described in Porazinska et al. (2009). The molecular taxonomic units (MOTUs) will be defined with two different approaches: i) based on >99.5% sequence identity (Floyd et al., 2002), and ii) using the recently developed software jMOTU (Jones et al., 2011).

Results from these two approaches will allow for an estimate of a baseline number of specimen per soil sample that is needed to describe the species diversity in a given field/region in Switzerland.

#### References

- FLOYD, R. et al. 2002: Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molec. Ecol.* **11**, 839-850.
- HOLTERMAN et al. 2009: Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding. *Phytopathology*. **99**, 227-235.
- JONES et al. 2011. jMOTU and taxonator: Turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLOS one* **6**: e19259. Doi10.1371/journal.pone.0019259.
- PORAZINSKA et al. 2009 : Nematode spatial and ecological patterns from tropical and temperate rainforests. *Mol. Ecol. Res.* **9**,1439-1450.

VAN MINGEN et al. 2009: A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*. **11**, 927-950.

## 168 - Validierung des Flotationsverfahrens für Zystennematoden

*Validation of the flotation method to detect cyst nematodes*

**Uwe Preiß, Bernd Augustin, Judith Ginsberg**

Dienstleistungszentrum ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück Rüdesheimer Strasse 60-68, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland, uwe.preiss@dlr.rlp.de

In der Laborarbeit erlangt die Qualitätssicherung zunehmende Bedeutung. Im Rahmen der Vorbereitung der Akkreditierung des Diagnoselabors am Dienstleistungszentrum ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück in Bad Kreuznach nach DIN ISO 17025 der deutschen Akkreditierungsstelle (DAKKS) wurde die Extraktion und Identifikation von Kartoffelzystennematoden (KZN) validiert.

Grundlage für den Validierungsplan sind die PM 7/98 (1) der EPPO (European Plant Protection Organization), sowie die spezifischen Diagnostikprotokolle. Der Anwendungsschwerpunkt des Prüfverfahrens liegt beim Nachweis der Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochiensis* und *Globodera pallida* in Substraten und Bodenproben. Methodisch wird in Anlehnung an das OEPP/EPPO Diagnostic protocol PM 7/40(2) gearbeitet. Als Extraktionsverfahren diente der MEKU-Bodenprobenextraktor der Fa. Pollähne mit folgenden Grundeinstellungen:

- Modus: getrocknete Bodenproben
- Extraktionsdauer (180 s) / Pausenintervall (3 s)
- Einspüldruck: 65 bar
- Druck Gegenstrom: 2,5 bar
- Siebkombination (Durchmesser 20 cm) in mm: 2,5 / 0,25
- Es wurden folgende Substrate verwendet denen null bis vier Kartoffelnematodenzysten zugegeben wurden:
- Reiner Löß (pH 7,7; 0,16 % TS Subst.)
- Lößlehm (pH 7,6; 1,09 %TS)
- Lehmiger Sand (pH 7,6; 0,35 %TS)

Analytische Sensitivität

**Tab. 1** Sensitivitätsprüfung an der Nachweisgrenze

| Anzahl KZN-Zysten<br>in 400 ml Boden | absolute Anzahl<br>Prüfungen (n) | Befunde       |              |
|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------|
|                                      |                                  | RICHTIG % (n) | FALSCH % (n) |
| 0                                    | 59                               | 100 (59)      | 0 (0)        |
| 1                                    | 56                               | 97 (54)       | 3 (2)        |
| 2                                    | 60                               | 98 (59)       | 2 (1)        |
| 4                                    | 64                               | 100 (64)      | 0 (0)        |

Insgesamt wurden 239 Messungen durchgeführt. Die Akzeptanzgrenze für die Sensitivität wurde zu 99% eingehalten. Keine Probe wurde falsch positiv bewertet.

Analytische Spezifität

Die Ergebnisse der Spezifitätsprüfung zur Darstellung der selektiven Wiederfindung der Kartoffelzystennematoden (KZN) bei gleichzeitigem Vorhandensein ähnlich geformter Fremdkörper bzw.