

Afrapportering af Kartoffelafgiftsfondens projekter for året 2014.

Slutrapport

Titel.

Kortlægning af andre kartoffelvira end kartoffelvirus Y og bladrullevirus i vinterafprøvningen af den danske fremavl.

Projektansvarlig og deltagere.

Steen Lykke Nielsen, Aarhus Universitet, Institut for Agroøkologi (projektansvarlig).

Mogens Nicolaisen og Esmail Amiri, AU, Institut for Agroøkologi.

Ednar Wulff, Fødevarestyrelsen, Sektion for Plantediagnostik.

Lars Bødker, Dansk Landbrugsrådgivning – VFL.

Ole Søgaard Lund, Københavns Universitet, Institut for Plante- og Miljøvidenskab.

Resumé

Projektet er baseret på materiale fra vinterafprøvningen 2013, hvor Fødevarestyrelsen (FST) ekstraherede RNA fra læggekartoffelpartier, for at teste for forekomst af kartoffelvirus Y og kartoffelbladrullevirus. FST gemmer det overskydende ekstraherede RNA, og det har været udgangspunkt for nærværende undersøgelse, hvor der blev testet 486 læggekartoffelpartier for forekomst af kartoffelvirus A, M, S, X og kartoffelmop-topvirus. Hver prøve var én samleprøve af RNA fra 100 knolde fra hvert parti. Testen blev udført med kvantitativ PCR. Der blev ikke påvist Kartoffelvirus A, M og X i prøverne. Der blev påvist kartoffelvirus S i 37 prøver (8 %) og kartoffelmop-topvirus i 101 prøver (21 %) ud af de 486 undersøgte prøver.

Projektperiode

2014.

Projekts faglige forløb.

Formål.

Projektets formål var at kortlægge forekomsten af kartoffelvirus A, M, S, V, X og kartoffelmop-topvirus i den danske fremavl.

Metoder, resultater og diskussion.

Indledning.

Projektet blev udbudt som specialeemne til kandidatstuderende både på Københavns Universitet og Aarhus Universitet, men desværre uden held. Projektkonsortiet besluttede derfor at samle projektets lønsum til ansættelse af PhD Esmail Amiri, som i sommeren 2014 havde afsluttet sin PhD-ansættelse ved AU, Flakkebjerg, og som er rutineret i at køre PCR på virusprøver.

Testresultaterne er derfor dem, som Esmail Amiri kunne nå i sin én månedens ansættelsesperiode, og den efterfølgende vurdering og sammenskrivning af resultaterne er udført af de øvrige projektdeltagere og hér især Ednar Wulff, Mogens Nicolaisen og Steen Lykke Nielsen.

Metoder.

Kortlægningen af virus blev baseret på ekstraheret RNA fra FST's Plantediagnostiske Enheds vinterafprøvning af læggekartofler i 2013. RNAet var blevet opbevaret ved -20°C. Prøverne fra FST bestod for hvert læggekartoffelparti af RNA ekstraheret fra 100 knolde underopdelt i 10 samleprøver af RNA hver fra 10 knolde. For at nå at teste så mange partier som muligt blev de 10 samleprøver fra hvert parti yderligere slået sammen til én samlet prøve (bestående af RNA fra 100 knolde).

Der blev i litteraturen fundet publicerede real-time PCR-metoder til test for de nævnte vira undtagen kartoffelvirus V, som derfor udgik. Der blev anvendt en to-trins real-time RT-PCR metode til at kvantificere virusniveauet i prøverne. Først blev cDNA syntetiseret med et High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, California, USA). Derefter blev det syntetiserede cDNA fortyndet 10 gange i RNase -frit vand til brug for PCR amplifikation. Kvantitativ PCR amplifikation blev udført i et Vii7 apparat (Applied Biosystems) med dobbeltbestemmelse af hver prøve. Der blev anvendt TaqMan probe til alle vira undtagen kartoffelvirus M, hvor der blev anvendt SYBR® Green DNA farvestof (Applied Biosystems). En prøve blev opfattet som positiv, når signalet fra begge delprøver i dobbeltbestemmelsen oversteg en automatisk fastsat grænseværdi.

De anvendte primere og prober er angivet i følgende tabel.

Kartoffel -virus	Primernavn	Primersekvens	Reference
Mop-top	PMTV-1948F	5'-GTGATCAGATCCGCGTCCTT	
	PMTV-2017R	5'-CCACTGCAAAGAACCGATTTC	[1]
	PMTV-1970P	FAM-ACCAGAACTACGGTGCCGCGTCG-TAMRA	
S	PVS-1F	5'- AAGTGGTGATCATGTGTGCAAGCG	
	PVS-1R	5'- ATTGCAATGATCGAGTCCAAGGGC	[2]
	PVS-1P	FAM-ACTGTGGAGTTCCCAACAGGCGCAGT-TAMRA	
A	PVA 102-2F	5'-TGTCGATTTAGGTAAGTACTGCTGGGAC	
	PVA 102-2R	5'- TGCTTTGGTTTGTAAAGATAGCAAGTG	[3]
	PVA 101-2P	FAM-CACTACCAATGCTCAAAGGTAAGAGTGTCG-TAMRA	
X	PVX-1-F	5'-AAGCCTGAGCACAAATTCGC	
	PVX-1-R	5'-GCTTCAGACGGTGGCCG	[2]
	PVX-P	FAM-AATGGAGTCACCAACCCAGCTGCC-TAMRA	
M	PVM2/1-F	5'-GCCACATCYGAGGACATGAT	[4]
	PVM2/1-R	5'-GTGAGCTCSGGACCATTCAT	

1. Mumford R.A., Walsh K., Barker I., Boonham N. 2000 Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology* **90**(5), 448-453. (doi:10.1094/PHYTO.2000.90.5.448).
2. Mortimer-Jones S.M., Jones M.G.K., Jones R.A.C., Thomson G., Dwyer G.I. 2009 A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *Journal of Virological Methods* **161**(2), 289-296. (doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.027>).
3. Agindotan B.O., Shiel P.J., Berger P.H. 2007 Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **142**(1-2), 1-9. (doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.12.012>).

4. Crosslin J.M., Hamlin L.L. 2011 Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. *American journal of potato research* **88**(4), 333-338.

Resultater.

Der blev i alt testet 486 prøver (=kartoffelpartier). Der blev ikke påvist kartoffelvirus A, M og X i prøverne.

Der blev påvist KVS i 37 prøver, svarende til 8 % af de undersøgte prøver. Den relative koncentration af virus i den enkelte prøve udtrykkes som en Ct-værdi, hvor en lav Ct-værdi er udtryk for en høj koncentration af virus og en høj Ct-værdi er udtryk for en lav koncentration. Der blev fundet Ct-værdier i intervallet 27-37 fordelt med 16 prøver i intervallet Ct 27-30, 20 prøver i intervallet Ct 31-35 og 1 prøve i intervallet Ct 36-37. Den positive KVS-kontrol havde en Ct-værdi på 16.

Der blev påvist 101 positive KMTV prøver svarende til 21 % af prøverne med Ct-værdier på 26-38 fordelt med 15 prøver i intervallet Ct 26-30, 66 prøver i intervallet Ct 31-35 og 20 prøver i intervallet Ct 36-38. Den positive KMTV-kontrol havde en Ct-værdi på 20.

Diskussion.

PCR-testene blev udført på samleprøver, hvor RNA fra 100 knolde blev samlet til én prøve, derfor vides det ikke, hvor mange enkeltknolde som har været inficeret. De høje Ct-værdier (lave virusmængde) kan for eksempel være udtryk for, at kun én knold ud af de 100 var positiv, så den høje værdi er udtryk for en fortyndingseffekt, mens de lavere Ct-værdi kan tolkes som udtryk for, at flere knolde ud af de 100 er positive. De varierende Ct-værdier kan desuden være udtryk for, at viruset optræder i forskellig koncentration i de enkelte knolde.

Resultaterne for kartoffelvirus Y og kartoffelbladlulevirus fra vinterafprøvningen 2013, udført af Fødevarestyrelsen, Sektion for Plantediagnostik, viser, at 21 % af læggekartoffelpartierne var smittet med kartoffelvirus Y og 0,5 % var smittet med bladlulevirus. I vinterafprøvningen i perioden 1998-2009 var variationen i smittetrykket for kartoffelvirus Y og bladlulevirus henholdsvis 19 – 52 % og 0 - 15 % af de undersøgte læggekartoffelpartier (Anonym 1998-2009). Sammenlignet med de aktuelle resultater fra 2013, viser det, at smittetrykket i 2013-avlen var lavt.

I vinterafprøvningen i perioden 1988 – 1992 (Anonym 1988-1992) blev der desuden undersøgt for kartoffelvirus X. Virus X blev ikke påvist i nogen partier i perioden. De andre vira har ikke indgået i vinterafprøvningen. Der foreligger kun ældre undersøgelser af forekomsten af kartoffelvira, fra før Det danske Kartoffelmeristemprogram blev indført og medførte en stor reduktion af virusstrykket i kartoffelavlen. Rønne Kristensen (197?) angiver forekomsten af kartoffelvira i en skala som almindelig, ret almindelig, ret sjælden og sjælden. Kartoffelvirus A angives som ret sjælden, virus M som ret almindelig og virus X og virus S som almindelig. Virus Y og bladlulevirus angives som almindeligt forekommende.

Der er aldrig før undersøgt for kartoffelmop-topvirus i vinterafprøvningen. Forekomst af mop-topvirus i 21 % af partierne er høj. Da det er første gang, der testes for mop-topvirus i vinterafprøvningen, anbefales det, at resultatet verificeres ved test af mop-topvirus i en fremtidig vinterafprøvning. Det er imidlertid muligt at få oplysninger om lokaliteten af de positive mop-topvirus-partier og sammenligne dem med resultaterne af en kortlægning af forekomst af mop-topvirus baseret på undersøgelse af jordprøver fra 2008 (Nielsen et al. 2009). Resultaterne fremgår af kortet i fig. 1, hvor de blå prikker viser forekomst af mop-topvirus på lokaliteter fra 2013-afprøvningen, og de røde og gule prikker viser henholdsvis positive og negative jordprøver fra

2008-undersøgelsen. Der ses en pæn overensstemmelse mellem lokaliseringen af de positive prøver fra undersøgelseerne i 2008 og 2013.

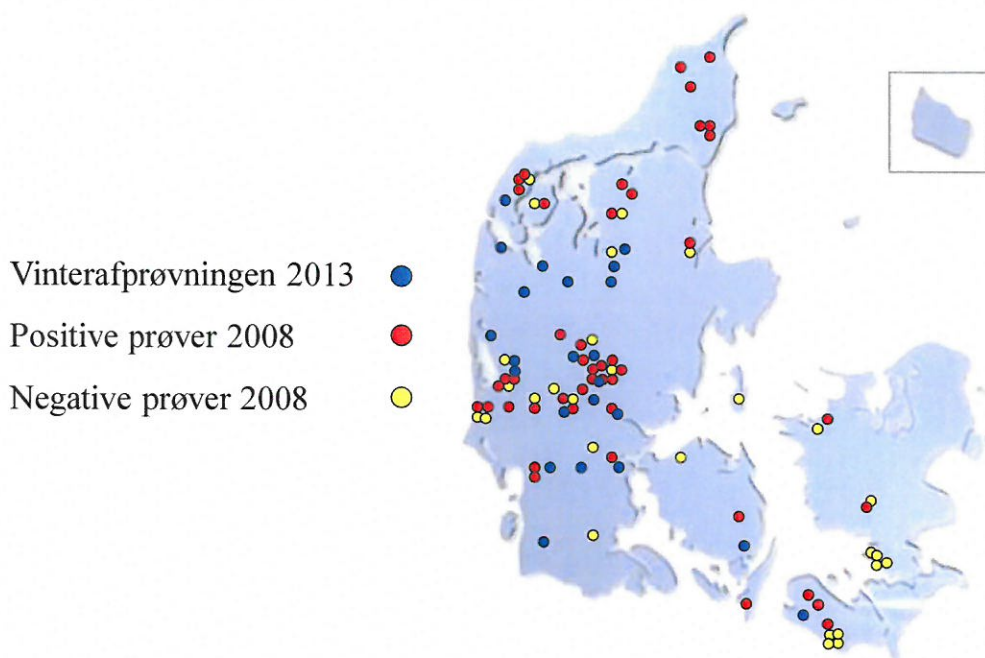


Fig. 1. Forekomst af kartoffelmop-topvirus i Danmark. Blå prikker viser forekomst af mop-topvirus på lokaliteter fra 2013-vinterafprøvningen. Røde og gule prikker viser henholdsvis positive og negative jordprøver for mop-topvirus fra 2008-undersøgelsen.

Litteratur

Anonym 1988–1992. Plantedirektoratet. Beretning 1988 (o.a. årstal). Landbrugs- og Fiskeriministeriet.

Anonym. 1998-2009. Plantedirektoratet. Beretning 1998 (o.a. årstal). Landbrugs- og Fiskeriministeriet.

Nielsen, S.L., Nicolaisen, M. & Kirk, H.G. 2009. Ny viden om mop-top i Danmark. Sammendrag af indlæg Plantekongres 2009. 13.-14. januar i Herning Kongrescenter.

Rønde Kristensen, H. 197x. Virussygdomme hos kartofler. Kartoffel•nyt nr. 18. Kartoffelafgiftsfonden 197x.

Offentliggørelser vedrørende projektet.

Resultaterne bliver publiceret i en artikel i Danske Kartofler Magasinet.

Flakkebjerg d. 5. januar 2015

Steen Lykke Nielsen, Projektleder