

Afrapportering af projekt støttet af KAF i 2012:

Titel:

Afprøvning af FTA-teknologi til måling af PVY på markniveau med henblik på forbedret beslutningsstøtte og egenkontrol af virushygiejne i læggekartofler.

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

Deltagende virksomhed: Danespo A/S, v. produktionschef Kim Madsen.

Andre deltagere: Jakob Ulstrup, specialestuderende (cand. agro. Sep. 2012)
Professor Ib Skovgaard, Institut for Grundvidenskab, Københavns Universitet.

Resume:

Projektets formål var at afprøve en ny metode til bedømmelse af graden af PVY virusinfektion på markniveau tidligt i vækstsæsonen. Den nye metode detekterer virus i bladsaft fra mange planter samtidig ved hjælp af en særlig papirmembran kaldet en FTA-membran (opkaldt efter producenten).

I 2012 blev der gennemført en afprøvning af FTA-metodens reproducerbarhed på tre marker med læggekartofler (Fakse) og med et PVY-infektionsniveau fra 0,3-6%. FTA-metoden blev desuden anvendt til at vurdere, i hvor høj grad infektionsprocenten kunne sænkes på markniveau ved bortlugning af planter med synlige virussympotomer.

Hvad angår reproducerbarhed fandtes FTA-metoden at variere med i gennemsnit en faktor 1,8 mellem to på hinanden følgende målinger af 930 testplanter pr mark. Selvom dette tal indikerer en betydelig måle-usikkerhed, betragter projektgruppen det som et foreløbigt tilfredsstillende resultat (Succeskriteriet i ansøgningen var en gennemsnitlig variation på mindre end en faktor 2,5).

Hvad angår effekt af lugning viste måling med FTA metoden, at lugning i gennemsnit fjernede ca 60% af de PVY inficerede planter.

Konklusionen fra forsøgene i 2012 er, at FTA metoden i sin nuværende form med forsigtighed kan anvendes til at bedømme PVY infektionsniveau tidligt i vækstsæsonen (Maj-Juni-Juli). Effekten af lugning kan bedømmes med metoden, men det vil det være nødvendigt med mere end en enkelt måling både før og efter lugning på grund af måle-usikkerheden.

Projektets faglige forløb.

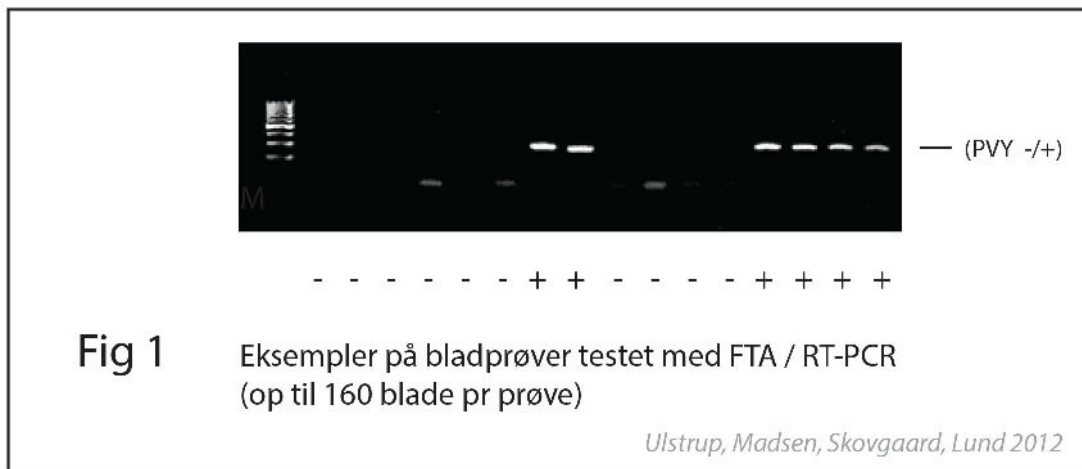
Formål:

Det overordnede formål var at teste muligheden for at bedømme graden af PVY infektion tidligt i vækstsæsonen uafhængigt af synlige virussympotomer.

Den valgte metode, FTA-RT-PCR, blev testet for sin reproducerbarhed og metoden blev også anvendt til at vurdere hvor stor en procentdel af de virusinficerede planter, der i praksis bliver fjernet ved bortlugning af planter med virussympotomer.

Kort om metoden:

Vi har valgt at bruge en såkaldt FTA-metode, der bygger på det princip, at virus kan måles direkte fra bladsaft tørret og opbevaret på en speciel papirmembran (FTA-membran). Selve målemetoden er en RT-PCR reaktion, hvis princip også kendes fra den danske knoldtest. I dette projekt har vi designet FTA-metoden, så der kan testes bladsaft af op til 160 blade samtidigt i en enkelt prøve. Hermed bliver det praktisk muligt, at måle selv lave virus-niveauer (<1%) uden at antallet af prøver bliver uoverskueligt stort. For at bedømme virusniveauet på en enkelt mark testedes i alt 930 blade fordelt på 15 prøver med varierende prøvestørrelse (10-160 planter pr prøve). Vi valgte at gennemføre testen i sorten, Fakse, der er moderat modtagelig for PVY og som ikke udviser specielt kraftige symptomer på infektion. Fakse er således en sort, hvor virusinfektion hyppigt forekommer, men som ikke er specielt nem at holde ren for virus ved hjælp af lugning (svage til moderate symptomer). Eksempler på målinger af bladprøver af Fakse (Positive eller negative for PVY) kan ses i Figur 1.



Resultater – pilotforsøg – udvælgelse af fremavlsmarker:

I et pilotforsøg testede vi 6 midtjyske marker med læggekartofler. Ud af de seks marker fandtes et måleligt niveau at PVY-virus i tre af markerne (0.3-6%). De tre PVY-positive marker udvalgte til de efterfølgende forsøg.

Resultater – reproducerbarhed:

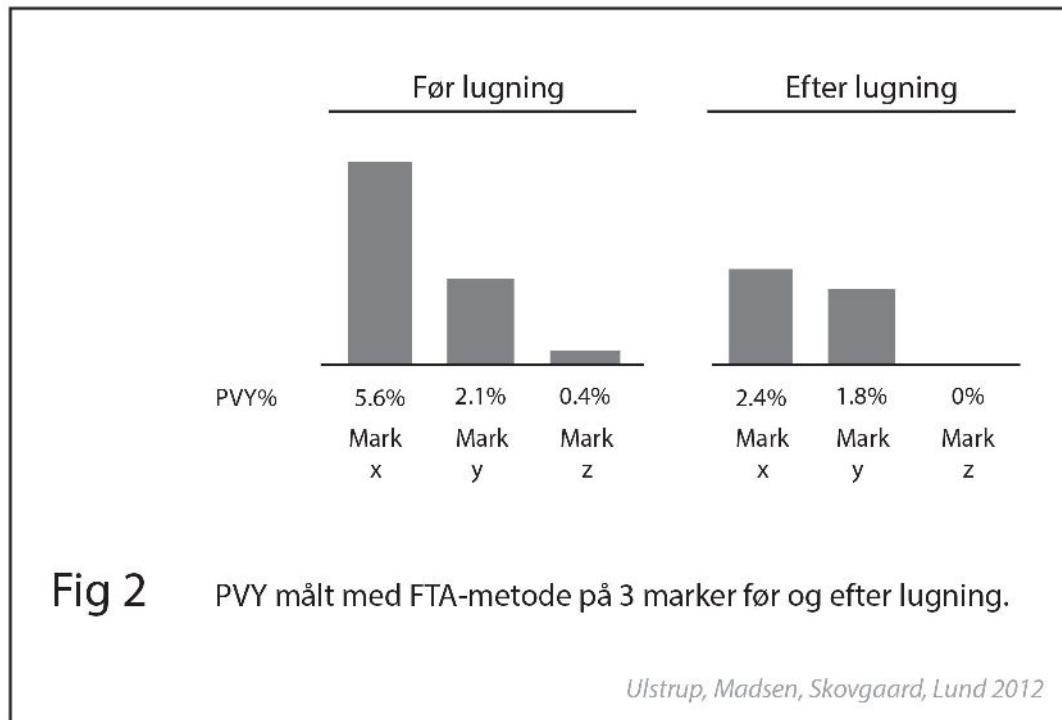
Med ca 14 dages mellemrum måltes de tre marker hver to gange i Juni med FTA-metoden. I perioden for målingerne lå det lokale bladlusindeks lavt (<1) i forhold til en måned senere, hvor indekset nåede op over 4.

Resultatet af de to målinger af hver mark viste, at der i gennemsnit var en faktor 1,8 til forskel imellem de to målinger i enten opadgående eller nedadgående retning. Der var ikke noget som tydede på, at virusniveauet generelt ændrede sig opad i forsøgsperioden, så indflydelsen fra evt bladlusmitte i forsøgsperioden må anses som ubetydelig.

Konklusion: Metoden fandtes at være rimeligt reproducerbar (1,8 fold variation) i forhold til ansøgningens succeskriterium: i gennemsnit højst en faktor 2,5 i forskel mellem uafhængige målinger af samme mark.

Resultater – effekt af lugning:

Måling af PVY-niveau blev gennemført både før og efter lugning. På alle tre test-marker kunne et fald i PVY-niveau måles efter lugning (Fig. 2). I gennemsnit sås en reduktion svarende til bortlugning af ca 60% af de PVY-positive planter. Ved brug af kvik-test (PVY pocket-kit) fandtes desuden, at langt hovedparten (ca 84%) af de bortlugede planter var PVY-positive.



Konklusion:

Den valgte FTA / RT-PCR-metode har vist sig at virke med en rimelig grad af reproducerbarhed i praksis og kan i sin nuværende form med forsigtighed bruges til at bedømme PVY infektionsniveau tidligt i vækstsæsonen (Maj-Juni-Juli). I forhold til bedømmelse af lugeeffekt må flere prøver pr bedømmelse anses for at være nødvendige, da måleusikkerheden på den enkelte prøve er betydelig i forhold til den forventede effekt af lugning.

I forhold til videre udvikling af metoden vil især en reduktion af tidsforbruget ved indsamling af prøvemateriale være ønskeligt samt en grundig sammenligning med tilsvarende data fra knoldtesten foretaget både før og efter dyrkning.

Detaljeret gennemgang af metode og resultater kan ses i specialerapport indgivet og forsvaret af Jakob Ulstrup (cand. agro sep. 2012) på Københavns Universitet. Afhandlingens titel:

FTA/RT-PCR as a Tool to Assess Potato Virus Y Infection at Field Level. Resultaterne for 2012 og 2013 vil blive fremlagt samlet på Plantekongressen 2014.