

## **Afrapportering af Kartoffelafgiftsfondens projekter for året 2014.**

### **Slutrapport**

#### **Titel.**

**Kortlægning af kartoffelvirus A, M, S, X og kartoffelmop-topvirus i vinterafprøvningen 2015.**

#### **Projektansvarlig og deltagere.**

Mogens Nicolaisen, AU, Institut for Agroøkologi (projektleder)

Jose Fernando Gil, AU, Institut for Agroøkologi.

Ednar Wulff, Fødevarestyrelsen, Sektion for Plantediagnostik.

Merete Halkjær Olesen, Fødevarestyrelsen, Sektion for Plantediagnostik.

#### **Resumé**

Projektet er en opfølgning på et projekt fra 2014 (Kortlægning af andre kartoffelvira end kartoffelvirus Y og bladrullevirus i vinterafprøvningen af den danske fremavl). Vi undersøgte forekomsten af kartoffelvirus PVA, PVM, PVX, PVS, PMTV i vinterafprøvningen ved at udnytte materiale (RNA) fra Fødevarestyrelsens (FVST) årlige test for forekomst af kartoffelvirus Y og kartoffelbladrullevirus. I dette projekt har vi udført de samme analyser på materiale fra vinterafprøvningen fra året efter. FVST gemmer som nævnt det overskydende ekstraherede RNA fra deres tests, og det har været udgangspunkt for nærværende undersøgelse, hvor der blev testet 488 læggekartoffelpartier for forekomst af kartoffelvirus A, M, S, X og kartoffelmop-topvirus (PMTV). Hver prøve var én samleprøve af RNA fra 100 knolde fra hvert parti. Testen blev udført med kvantitativ PCR. Der blev ikke påvist PVA og PVM i prøverne. Der blev påvist PVX i 7 prøver (1.4 %), PVS i 32 prøver (7 %) og PMTV i 65 prøver (13 %) ud af de 488 undersøgte prøver. Denne undersøgelse bekræfter de overraskende høje fund af PVS og PMTV fra året før.

#### **Projektperiode**

2015.

#### **Projekts faglige forløb.**

##### Formål.

Projektets formål var at kortlægge forekomsten af PVS, PVX, PVA, PVM og PMTV i den danske fremavl og specifikt at efterprøve resultaterne fra det foregående år.

##### Indledning.

Vi ved ikke meget om forekomsten af PVS, PVX, PVA, PVM og PMTV i læggekartoffelproduktionen i Danmark, og der er ikke lavet en kortlægning af virus gennem de sidste mange år. Fødevarestyrelsens Plantediagnostiske Enhed har indvilget i at stille materiale fra vinterafprøvningen til rådighed, og da testen for kartoffelvirus Y og bladrullevirus allerede foretages med PCR, vil vi få adgang til ekstraheret RNA, som umiddelbart kan anvendes til at undersøge for forekomst af de andre virus.

Der blev på ovennævnte baggrund lavet en undersøgelse for sæsonen 2013. Da der blev fundet overraskende høje forekomster af PMTV (21%) og PVS (7%) var der behov for en verificering af resultaterne i den kommende sæson. Denne rapport beskriver resultaterne fra undersøgelsen for sæsonen 2014.

## Metoder.

Metoderne er som beskrevet for det tilsvarende projekt sidste år. For overskuelighedens skyld er beskrivelsen af procedurerne gentaget i nærværende rapport.

Kortlægningen af virus blev baseret på ekstraheret RNA fra FVST's Plantediagnostiske Enheds vinterafprøvning af læggekartofler i 2014. RNA'et var blevet opbevaret ved -20°C. Prøverne fra FVST 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 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 X til brug for PCR amplifikation. Kvantitativ PCR amplifikation blev udført i et ViiA 7 apparat (Applied Biosystems) med dobbeltbestemmelse af hver prøve og med et qPCR BIO ProbeMix. Der blev anvendt en TaqMan probe til alle vira undtagen kartoffelvirus M, hvor der blev anvendt gelbestemmelse. 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
<b>PMTV</b>	PMTV-1948F	5'-GTGATCAGATCCGCGTCCTT	
	PMTV-2017R	5'-CCACTGCAAAAGAACCGATTTTC	[1]
	PMTV-1970P	FAM-ACCAGAACTACGGTGCCGCGTCG-TAMRA	
<b>PVS</b>	PVS-1F	5'- AAGTGGTGATCATGTGTGCAAGCG	
	PVS-1R	5'- ATTGCAATGATCGAGTCCAAGGGC	[2]
	PVS-1P	FAM-ACTGTGGAGTTCCCAACAGGCGCAGT-TAMRA	
<b>PVA</b>	PVA 102-2F	5'-TGTCGATTTAGGTACTGCTGGGAC	
	PVA 102-2R	5'- TGCTTTGGTTTGTAAGATAGCAAGTG	[3]
	PVA 101-2P	FAM-CACTACCAATGCTCAAAGGTAAGAGTGTCG-TAMRA	
<b>PVX</b>	PVX-1-F	5'-AAGCCTGAGCACAAATTCGC	
	PVX-1-R	5'-GCTTCAGACGGTGGCCG	[2]
	PVX-P	FAM-AATGGAGTCACCAACCCAGCTGCC-TAMRA	
<b>PVM</b>	PVM2/1-F	5'-GCCACATCYGAGGACATGAT	[4]
	PVM2/1-R	5'-GTGAGCTCSGGACCATTTCAT	

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 488 prøver (=kartoffelpartier). Der blev ikke påvist kartoffelvirus A og M i prøverne.

Der blev påvist PVX i 7 prøver svarende til 1 % af de undersøgte prøver (spredt forekomst over landet).

Der blev påvist PMTV i 65 prøver svarende til 13 % af prøverne (Tabel 1 og Figur 1).

Der blev påvist PVS i 32 prøver, svarende til 7 % af de undersøgte prøver (Tabel 2 og Figur 2).

## Diskussion.

I undersøgelserne fra sæsonen 2013 blev der påvist et overraskende højt niveau af PMTV og PVS i materialet. For at få disse resultater efterprøvet, blev det besluttet at gentage undersøgelsen for det efterfølgende år (sæsonen 2014).

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. Et enkelt positivt testresultat kan således betyde at mellem 1 – 100 knolde i partiet er inficeret. Det kan dog ikke udelukkes at en enkelt svagt inficeret knold blandt 99 sunde knolde ikke påvises da man i sådanne tilfælde kan komme under detektionsgrænsen.

Resultaterne fra dette års undersøgelse konfirmerede resultaterne fra 2013, dvs. at der blev fundet relativt høje forekomster af PVS og PMTV (Tabel 1 og 2). Niveauet af PVS var næsten ens for de 2 år, (8 % i 2013 vs 7 % i 2014), mens der blev fundet et noget lavere niveau af PMTV i 2014 (21 % i 2013 vs 13 % i 2014). Der blev fundet enkelte prøver (1 %) med PVX, men niveauet af virus i disse enkelte prøver var ret lavt, hvilket tyder på, at kun ganske få af de 100 poolede knolde har været inficerede (data ikke vist). Samtidig var fundene af PVX positive knolde spredt over landet. Forskellen på niveauet af PMTV mellem de to år må anses for at ligge indenfor hvad man kan forvente af biologisk variation. Der kunne f.eks. have været klimaforskelle mellem de to år som har givet forskellige vækstvilkår for PMTVs vektor, *Spongospora subterranea*.

Der er aldrig før undersøgt for PMTV i vinterafprøvningen. Forekomst af PMTV i partierne er overraskende høj (hvilket også gælder for PVS). Prøverne blev inddelt i 7 områder, se figur 1. Den procentvise forekomst af PMTV hhv. PVS viste at begge virus forekommer på alle lokaliteter, dog med forskelle i den relative forekomst (Figur 1 og 2 samt Tabel 1 og 2). PMTV synes at være sjældnere i Thy/Mors i sammenligning med de andre områder og PVS synes at være hyppigere i Midtjylland omkring Herning, Viborg og Holstebro. Der er ikke foretaget en egentlig statistisk analyse af resultaterne hvorfor disse skal tages med noget forbehold, især hvis man leder efter årsager til forskellene i forekomsten. F.eks. kan der være interaktioner med andre faktorer såsom valg af sort i de forskellige områder. I øvrigt var det ikke muligt at se nogen klar sammenhæng mellem sortsvalg og forekomsten af virus, hovedsageligt fordi der indgik mange sorter i

undersøgelserne og der følgelig ikke var mange data tilgængelige for den enkelte sort (data ikke vist).

For en yderligere diskussion af resultaterne henvises til afrapporteringen af det tilsvarende projekt fra sidste år.



Fig. 1. Forekomst af PMTV i Danmark samlet for 2013 og 2014. Lagkagediagrammerne viser den procentvise forekomst af PMTV i: Sønderjylland (f.eks. Vejen, Kolding og sydligere) (total antal prøver  $n = 33$ ); Sydlige Vestjylland (f.eks. Ringkøbing, Esbjerg, Tarm, Skjern) ( $n = 196$ ); Midtjylland syd (f.eks. Give, Grindsted, Billund, Ejstrupholm) ( $n = 149$ ); Midtjylland nord (f.eks. Herning, Holstebro, Struer, Viborg, Vinderup) ( $n = 253$ ); Thy og Mors ( $n = 169$ ); Sjælland og Lolland Falster ( $n = 47$ ).



Fig. 2. Forekomst af PVS i Danmark samlet for 2013 og 2014. Lagkagediagrammerne viser den procentvise forekomst af PMTV i: Sønderjylland (f.eks. Vejen, Kolding og sydligere) (total antal prøver n = 33); Sydlige Vestjylland (f.eks. Ringkøbing, Esbjerg, Tarm, Skjern) (n = 196); Midtjylland syd (f.eks. Give, Grindsted, Billund, Ejstrupholm) (n = 149); Midtjylland nord (f.eks. Herning, Holstebro, Struer, Viborg, Vinderup) (n = 253); Thy og Mors (n = 169); Sjælland og Lolland Falster (n = 47).

Tabel 1. Forekomst af PMTV i Danmark for 2013 og 2014.

PMTV forekomst i områder	2013			2014			Total			
	Total	Positive	Procent	Total	Positive	Procent	Antal prøv	Total	Positive	Procent
A	16	7	44	17	4	24	33	11	<b>33</b>	
B	95	17	18	101	16	16	196	33	<b>17</b>	
C	65	24	37	84	16	19	149	40	<b>27</b>	
D	136	34	25	117	17	15	253	51	<b>20</b>	
E	77	3	4	92	3	3	169	6	<b>4</b>	
F	Ingen prøver i 2013			47	3	6	47	3	<b>6</b>	
A	Sønderjylland, Vejen, Kolding og sydligere									
B	Sydlige vestjylland: Ringkøbing, Esbjerg, Tarm, Skjern									
C	Midtjylland syd: Give, Grindsted, Billund, Ejstrupholm									
D	Midtjylland nord: Herning, Holstebro, Struer, Viborg, Vinderup									
E	Thy og Mors									
F	Sjælland og Lolland Falster: Jægerspris, Maribo									

Tabel 2. Forekomst af PVS i Danmark for 2013 og 2014.

PVS forekomst i områder									
	2013			2014			Total		
	Total	Positive	Procent	Total	Positive	Procent	Total	Positive	Procent
A	16	1	6	17	1	6	33	2	<b>6</b>
B	95	1	1	101	6	6	196	7	<b>4</b>
C	65	7	11	84	2	2	149	9	<b>6</b>
D	136	18	13	117	16	14	253	34	<b>13</b>
E	77	1	1	92	3	3	169	4	<b>2</b>
F	Ingen prøver i 2013			47	3	6	47	3	<b>6</b>

### 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. 197?. Virussygdomme hos kartofler. Kartoffelnyt nr. 18. Kartoffelafgiftsfonden 197x.

### **Offentliggørelser vedrørende projektet.**

Resultaterne påtænkes publiceret i en artikel i Danske Kartofler Magasinet og eventuelt i en 'Short communication' i et peer-reviewed tidsskrift.

Hovedparten af projektets samlede lønsum gik til ansættelse af PhD Jose Fernando Gil som under sin PhD ved AU, Institut for Agroøkologi har beskæftiget sig med undersøgelser af nye typer af PMTV og beslægtede vira fra kartoffel-dyrkende områder af Colombia. Testresultaterne er dem, som Jose kunne nå i sin ansættelsesperiode. Den efterfølgende vurdering og sammenskrivning af resultaterne er udført af Mogens Nicolaisen.

Flakkebjerg d. 22. februar 2016

Mogens Nicolaisen  
Projektleder