

Säker diagnos och utbredning av rostringar i potatis

Paula Persson, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för växtproduktionsekologi, Box 7043, 75007 Uppsala

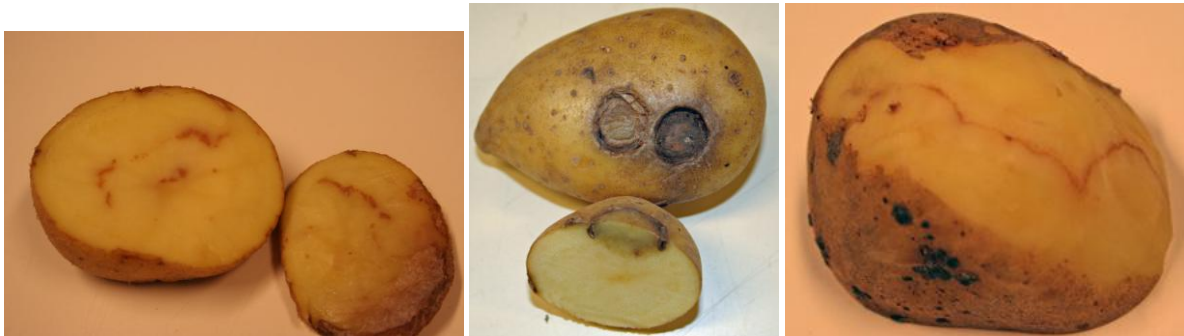


Fig. 1 Exempel på rostringssymptom i potatis. Knölprover inskickade till projektet.

Inledning

Rostringar och rostfläckar, nekrotiska eller färgförändrade bågar och fläckar inuti potatisknölar, är orsakade av två virus: *Potatis mopp-topp virus*, PMTV och *Tobak rattel virus*, TRV. Rostringar är ett allvarligt kvalitetsproblem i matpotatis för direktkonsumtion men också för industripotatis då knölar med symptom inte kan användas till chips eller pommes frites.

Båda virusen är vitt spridda i potatisproducerande områden i världen. I USA och Kanada har rostringar ”corky ring spot” varit associerade med TRV medan PMTV har identifierats under senare år (Xu et al. 2004). I Europa detekterades PMTV först på Irland, i England och i Skottland och har också påvisats i Nederländerna men har aldrig officiellt rapporterats därifrån. I de nordiska länderna har PMTV förekommit under de senaste trettio åren men konstaterades redan i slutet av 60-talet i Norge (Bjørnstad 1969). Maria Sandgren inventerade förekomst av PMTV i Sverige under slutet av 1980-talet och början av 90-talet och fann en riklig förekomst framförallt i de västra och södra delarna av landet (Sandgren, 1995). Rostringar orsakade av TRV är sedan länge kända i Sverige men någon regelrätt inventering har inte utförts tidigare. Rostringar orsakade av TRV anses vara ovanliga i Finland men förekommer både i Norge och Danmark. De nematoder som överför TRV viruset är vanliga och frekvent förekommande i hela Norden (Fig. 2).

Distribution
Trichodorider i Norden

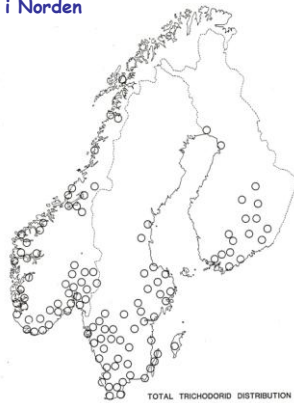


Fig 2. Utbredning av stubbrotsnematoder

(efter professor B. Eriksson, SLU).

Biologi PMTV. Virusets vektor är den jordburna potatispatogenen *Spongospora subterranea* som orsakar pulverkorv, vars tjockväggiga vilsporer kan överleva mycket länge i marken med PMTV virus i. Jordprov lagrat i +4 °C i mer än 16 år visade smittöverföring till tobaksplanter (Ulrike Beuch muntl.). Fuktiga och svala förhållanden under växtsäsongen gynnar pulverkorvens möjlighet att angripa planter och därmed också överföra PMTV virus. PMTV har få värdväxter förutom potatis men ogräs inom släktet *Solanaceae* är mottagliga såsom nattskatta *S. nigrum* och bågarnattskatta *S. phylsalipholium* som börjar spridas i Sverige. PMTV smitta överförs också via utsäde, den allvarligaste spridningsformen.

Biologi TRV. Detta virus vektorer är stubbrotsnematoder, s.k. migrerande nematoder inom släktena *Trichodorus* och *Paratrichodorus*. Nematoderna är små men kan i uppförstoring kännas igen på sin böjda muntagg (Fig. 3)



Fig. 3

Nematoderna migrerar med vattennivån i marken och tar sig till djupare lager när det blir torrt. TRV virus är jordburet och lever i stubbrotsnematoderna. TRV överförs dock inte till nematodernas avkomma. Man vet inte hur gammal en nematod kan bli men troligen kan TRV överförs av en nematod i två.

Till skillnad från PMTV har TRV mängder av värdväxter som det kan uppförökas i. Nematoderna föder också på många värdväxter. Mycket mottagliga TRV växter är de vanliga ogräsen våtarv, lomme och kvickrot. Nematoderna trivs och uppförökas särskilt väl på rajgräs och korn.

Virusens sammansättning. Både TRV och PMTV består av RNA partiklar (Fig. 4). Två stycken för TRV och tre för PMTV. PMTV partiklarna finns alltid tillsammans medan TRVs båda partiklar ofta är separerade dvs. att det är vanligt att RNA 1 partikeln är ensamt förekommande, t.ex. i en knöl. TRV-viruset kan med denna enda partikel förflytta sig och även ge upphov till symptombildning. Detektion av TRV virus måste därför fokuseras på RNA 1 partikeln för att få en korrekt bild av förekomsten av viruset. För att kunna vara överförare av TRV virus måste nematoderna ha båda partiklarna i sig.

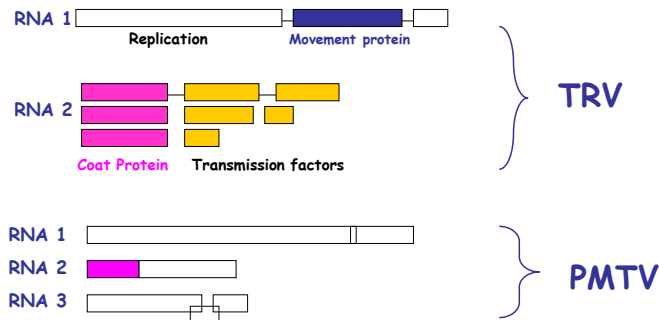


Fig. 4 Virusens sammansättning

Pga. att TRVs RNA partiklar ofta är separerade är risken för utsädesmitta låg och finns endast RNA1 i utsädesknölen kan inte viruset föras över till nematoderna (Fig. 5)

Utsädesmitta TRV - låg risk för introduktion i fältet

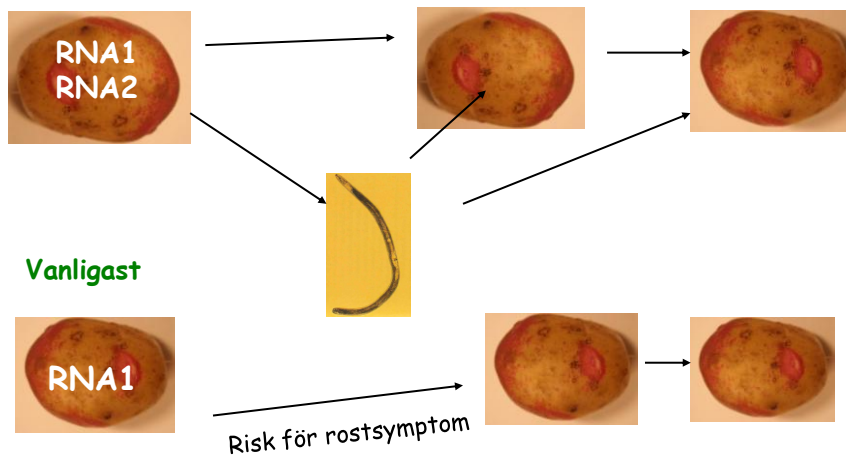


Fig. 5

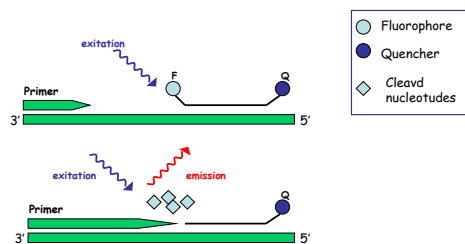
Internationellt samarbete

Projektet har varit knutit till det internationella projektet ”Enhanced controle of *Potato Mop-Top Virus* in the Nordic and Baltic Sea Region” ett samarbetsprojekt mellan 10 länder som pågick 2005-2009 koordinerat av professor Jari Valkonen, Helsingfors universitet. Förutom årliga projekt work-skops har projektledare Paula Persson varit med på två arbetsmöten där i det ena fallet studerades PMTVs symptomutveckling i blast vilket gjordes i ett fält på Jaeren i västra Norge där man sedan många år sätter utsädespartier för bedömning av smitta. I det andra arbetsmötet på Bioforsk, Ås, Norge diskuterades och arbetades med diagnosmetoder och provberedning av knöl och jordprover.

Material och metoder

Diagnos av rostringssymptom på knölar eller detektion av virusförekomst i knölar utan symptom har i projektet gjorts med molekylär analysmetodik s.k. realtids PCR, polymerase chain reaction. Denna utveckling av PCR metoden gör det möjligt att kvantifiera det DNA eller RNA som studeras. En stor fördel är att man i en och samma reaktion kan detektera mer än en typ av DNA/RNA och detta har vi utnyttjat i projektet. PCR kräver specifika DNA primrar och för rostringsviroserna har i projektet använts de som beskrivs i ett arbete från England (Mumford *et al.* 2000). Steg ett i analysen är extraktion av virus-RNA från knöl och plantmaterial. För att optimera utbytet av RNA jämfördes flera kommersiellt tillgängliga extraktionskits. Steg två i analysen är själva realtids PCR reaktionen med målet att kunna detektera båda virusen samtidigt. Den måste då ske efter den s.k. TaqMan principen. Reaktionen kräver då förutom specifika primerpar för båda virusen också specifika prober för respektive virus (Fig. 6). Eftersom PMTV och TRV består av RNA partiklar måste dessa med enzymet transkriptas överföras till komplementär cDNA, pga. av att PCR reaktionen kräver DNA för att kunna genomföras. I figur 7 listats de ingredienser som behövs för en realtids PCR och figur 8 anger de steg och temperaturer som krävs. Efter extraktionen av RNA ur prover kan hela reaktionen ske i ett steg (Fig. 8). Realtids PCR analysen går i 40 cykler och nytt DNA byggs kontinuerligt upp och probens kopplade fluorescerande färgämne registreras. Fluorescensen ”emission” läses av kontinuerligt och stiger exponentiellt, vilket visualiseras i en s-kurva (Fig. 9 och 10).

REAL-TIME PCR “TaqMan Probe principle”



- Sample - RNA particles - extraction using Qiagen RNeasy plant mini kit
- Transcriptas - enzym transcribing RNA to cDNA
- “Primers” - TRV and PMTV specific cDNA
- Probe - specific cDNA for TRV respectively linked with a two different fluorescent dies
- Polymeras - enzym bildning new DNA
- Nucleotides - A C G T



Fig. 6. Principen för realtids PCR

Fig 7. Cocktail av reagens till en realtids PCR

One step Real-time PCR analysis

Reverse Transcript step cDNA sythesis 50°C 10 min
minutes

2 step cycling: 40 cycles

•Denaturation 95° C10 sek

•Annealing/extension 60° C30 sek

with reading of fluorescence



Fig. 8 Ett-steps realtids PCR.

Visualisering av realtids PCR. Figurerna 9 och 10 nedan visar exempel på resultat av realtids PCR reaktioner.

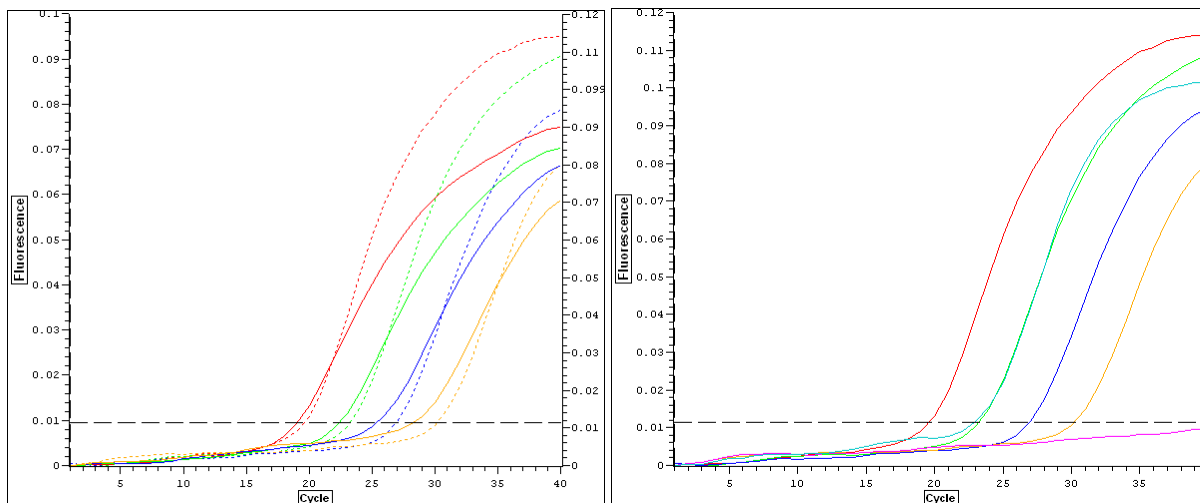


Fig. 8. Analysresultat från växtmaterial med TRV (heldragna linjer) och PMTV (streckade linjer) i fyra koncentrationer. Röd kurva utgör den högsta koncentrationen.

Fig 9. Två okända prover tillsammans en koncentrationsstege av PMTV kontroller. Ljusgrön kurva som sammanfaller med näst högsta koncentrationen är ett PMTV positivt prov medan den lila raka linjen i botten av figuren är ett negativt prov.

Lantbrukarprover

Efter kontakt med rådgivare, lantbrukare, kontrollmyndigheter och organisationer har knölprover med synliga symptom av rostringar skickats in till laboriet i Uppsala. Knölna lagrades i +4 - + 8 °C fram till analys. Provberedning för RNA extraktion kan utgöra 150 till maximalt 200 mg prov och därför skars knappt en cm³ stora prover ut från knölvävnad i anslutning till symptom. Proverna placerades i en påse (en dm²) av kraftig plast

och mosades sönder med mortel tillsammans med extraktionsbuffert. Efter utvärdering av flera kommersiellt tillgängliga extraktionskits valdes RNA Plant Mini kit från Qiagen AB som gav ett högt RNA utbyte. Till ett-steps realtids PCR användes reaktionsmix från Biorad.

Jordprover

Vid analys av rostringsvirus i inkomna jordprover planterades tre tobaksarter, kända för att vara mycket mottagliga för TRV och PMTV, i de insända proverna. Plantor av *Nicotiana benthamiana*, *N. tabaci* (sort Samsun) och *N. debneyii*, drogs initialt upp i växthus vid + 25° och skolades ut efter tre veckor. Efter ytterligare tre veckor planterades småplantor av samtliga tobaksarter i dubbelprover av insänd jord. Plantorna fick växa i sju veckor i växthus + 22 °grader varefter plantornas rötter tvättades mycket noga och placerades i frys (-20°). Vid analys togs rotbitar omkring en cm³ stora och placerades i tjockväggiga plastpåsar och bankades sönder med en hammare. Extraktionen bereddes enligt samma princip som för knölproverna beskrivna ovan.

Resultat

I projektet har analyserats *knölprover* från 120 fält, från olika platser i landet. Flera knölar har analyserats från varje prov. Den helt övervägande delen av de analyserade knölproverna visade någon typ av rostrings/rostfläck symptom. Variationen i symptom avspeglas i bilderna i Fig. 1 i inledningen.

* Fördelningen mellan TRV och PMTV var likartad med 55 % PMTV och 45% TRV positiva prover.

* Ett fåtal prover 5% har analyserna visat infektion av både TRV och PMTV.

* Latent infektion (symptomfri) av PMTV har konstaterats i prover av sorten King Edward och latent TRV har konstaterats i sorterna Pentland och Folva, utan symptom.

*Följande sorter har visat positiv reaktion av **PMTV**:

Sava

Fakse

Matilda

Berber

Jutlandia

Lady Rosetta

Saturna

van Gough

Triumph

Inova

Folva

King Edward (utan symptom)

Följande sorter har visat positiv reaktion av **TRV**:

King Edward

Nicola

Vitess

Cherie

Ukama

Amandine

Matilda

Isle of Jura

Princess

Terra Gould

Maritema

Inova

Lady Balfour

Mandel

Verity

Pentland (utan symptom)

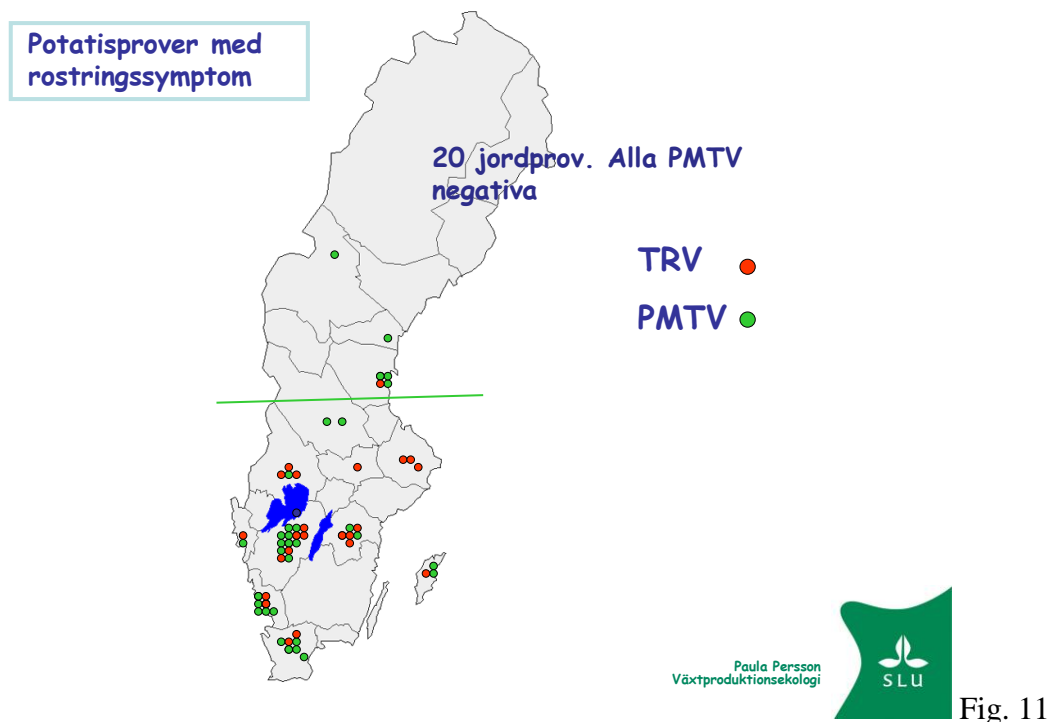
Bintje

Folva (utan symptom)

Challenger

* *Jordprover*: 48 jordprover är analyserade. Det är främst misstanke om PMTV som föranlett provtagningen vilket visar 17 positiva PMTV prover och 5 TRV positiva prover. 20 jordprover uttagna från utsädesdistrikt i Väster- och Norrbotten visade samtliga negativa PMTV resultat.

Figur 10 visar PMTV och TRV *utbredningen* i Sverige. Den gröna vågräta linjen visar nordlig utbredningen av PMTV enligt inventering utförd av Sandgren (1995) i början av 1990-talet .



Diskussion och erfarenheter

Diagnosmetoden

Projektet har för TRV och PMTV använt en utveckling av PCR metoden kallad realtid PCR eller qPCR kvantitativ PCR, i en multiplex variant vilket betyder att man detekterar flera olika DNA/RNA i en och samma analys. Man skulle kunna tänka sig att använda immunologisk analysmetodik såsom ELISA. Detta går utmärkt för PMTV men som framgår i inledningen är TRV ett virus som inte alltid existerar med båda sina RNA partiklar samtidigt utan saknar ofta den partikel som innehåller RNA som kodar för bildningen av coat-proteinet, vilket är nödvändig för detektion med ELISA. Utvecklingen av molekylärbiologiska analyser har med åren gjort metodiken mer och mer användarvänlig. Idag finns dessutom på marknaden en mängd ”kits” för försteget till PCR analysen dvs. extraktion av DNA/RNA. Dessa extraktionskits är visserligen dyra men sparar mycket arbetstid. Möjligheten att diagnostisera och detektera RNA virus genom att i en och samma analys, först överföra RNA till cDNA (nödvändigt för PCR) och sedan ha möjlighet att detektera flera virus i ett och samma prov, är för rostringar mycket användbart. Analyserna ger ett klart svar och antyder också hur mycket virus ett prov innehåller.

Erfarenhet av symptom/latent infektion

Studier av symptomen på insända knölar visar att det inte går att avgöra okulärt om symtomen är orsakade av TRV eller PMTV. Några iakttagelser har dock gjorts.

* Mycket kraftig nekros (se mittbilden av Fig. 1) har i PCR analysen visat positiv reaktion för TRV i samtliga fall. Denna typ av symptom noterades i tre sorter Bintje, Amandine och Inova.

* Sorten King Edward VII (KE) synes inte utveckla symptom av PMTV men däremot av TRV. Inkomna KE prover med rostringssymtom var i alla fall TRV. Det motsatta gällde sorterna Faxe och Sava. Av båda dessa sorter kom flera prov med symptom som samtliga fall var PMTV smitta.

* I de analyser av rostringssymptom som gjorts i projektet har näst intill samtliga visat positiv reaktion av antingen PMTV eller TRV. I några fall har båda virusen varit närvarande samtidigt. Rostfläckar var också ett symptom som förekom i flera insända prover. Man har tidigare spekulerat om orsaken till dessa symptom. I detta projekts analyser fanns alltid virus med vid analys av rostfläcksymptom.

* Knölar från odling med importerat utsäde av KE, som utvecklade kraftig pulverskorv men inga rostringssymptom analyserades för eventuell virussmitta. Resultaten visade PMTV infektion i samtliga knölar som analyserades. Inga problem hade tidigare funnits med pulverskorv vid odling i samma fält. Ny smitta av två allvarliga potatispatogener med lång överlevnadstid i jorden hade därmed via utsädet introducerats till fält där dessa prover hade vuxit.

TRV smitta i knölar utan symptom har också konstaterats i sorterna Pentland och Folva. Icke synlig smitta av PMTV och TRV i utsädesknölar bidrar till spridning av virusen till nya områden. Finska undersökningar har påvisat hög latent PMTV smitta i flera potatissorter (Santala et al. 2010).

Det har länge i potatiskretsar diskuterats om TRV sprids med utsäde. Så är fallet (se Fig. 3). Eftersom viruset oftast förekommer med endast en av sina två RNA partiklar kan denna smitta inte föras vidare med vektorn – stubbrotsnematoden - och därmed stanna kvar i jorden. Men, TRV viruset med endast en partikel (RNA1) kan dock transporteras till dotterknölar och där orsaka symptom.

Tre insända prov av KE knölar med rostringar orsakade av TRV hade vuxit i tre fält där potatis inte odlats tidigare, sedan mycket länge eller inte alls. Den troliga orsaken till symptomen i dessa fall är att TRV smittan är närvarande i fälten, stubbrotsnematoden finns i fältet och TRV uppförökas i några av sina många värdväxter.

Att döma av den långa listan av insända potatissorter odlas det många sorter i Sverige som utvecklar rostsymptom. Några synes inte utveckla symptom av det ena eller det andra viruset men ett stort problem är att virusen kan finnas latent utan att visa symptom vilket innebär stor risk för spridning. Detta är särskilt fallet för spridningen av PMTV där smittan kan finnas i knölar eller utanpå i pulverskorvens vilsporor (Santala et al. 2010). Vi ser för PMTV med detta projekts inventering att smittan rör sig norrut. Tidigare inventering (Sandgren 1995) från början av 90-talet visade inga smittade partier norr om linjen som kartan visar (se Fig. 11). Nu har vi funnit PMTV i Hälsingland, Medelpad och norra Jämtland. Det är dock

tillfredsställande att ingen PMTV smitta kunnat påvisas i de 20-tal jordprover från utsädesdistrikt i Väster- och Norrbotten.

I det internationella projektet om PMTV där detta SLF finansierade projekt har ingått framgångsrik spridning av PMTV har i Norden men inte i de Baltiska länderna, Polen, Nordvästra Ryssland eller Tyskland (Santala et al. 2010). Den främsta orsaken till detta är frånvaro av handel med utsäde med länder som har smitta. Till projektet inbjöds forskare från Skottland redovisade mycket stor spridning av PMTV i Skottland då man analyserat jordprover från potatisodlade distrikt. Man ansåg däremot att man såg mycket lite rostringssymptom.

Referenser

- Björnstad, A. 1969. Spredning av potet mopp-topp virus (PMTV) i settepoteter. *Jord och avling* 2, 2-4.
- 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, 448-453.
- Sandgren, M. 1995. Potato mop-top virus (PMTV): distribution in Sweden, development of symptoms during storage and cultivar trials in field and glasshouse. *Potato Research* 38, 387-397.
- Santala, J., Samuilova, O., Hannukakala A., Latvala, S., Kortemaa, H., Beuch, U., Kvarnheden, A., Persson, P., Bungaard-Topp, K., Örstad, K., Spetz, C., Nilsen, S.L., Kirk, H.G. et al., Valkonen, J.P.T. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne virus in northern Europe. *Annals of Applied Biology* 157, 163-178
- Xu, H., DeHaan, T. L. & De Boer, S. H. 2004. Detection and confirmation of *Potato mop-top virus* in potatoes produced in the United States and Canada. *Plant Disease* 88, 363-367.

Förmedling av projektets resultat

Presentationer vid nationella konferenser och möten

- Persson, P. Rostringar i potatis. Presentation vid ”Potatisdag” in Skara 8 mars 2006, Hushållningssällskapet i Skaraborg
- Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Paschek, U. Rostringar i potatis. Växtskyddsdag SLU i Uppsala, 15 mars 2007
- Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Paschek, U. Rostringar – går det att undvika? Presentation på kursen “Friska potatisgrödor” Alvesta 21 oktober 2008 arranged av Jordbruksverket
- Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Beuch, U. Rostringar – går det att undvika? Presentation på “Potatisutsädesdag” i Skövde 18 November 2008, arrangerad av GRO
- Persson, P., Kvarnheden, A. & Beuch, U. 2009. Vad vet vi och vad gör vi med rostringar i potatis? Regional Växtodlings- och växtskyddskonferens i Uddevalla 15-16 januari 2009
- Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Beuch, U. 2009. Rostringar i potatis - diagnos och inventering. Växtskyddsdag SLU, Uppsala 30 Mars 2009
- Persson, P. & Färeby, L. 2010. Nematoder och rostringar i potatis. Presentation på kursen ”Nematoder i grönsaks- och potatisväxtföljder” 17 februari 2010, arrangerad av Hushållningssällskapet i Kristianstad.

Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Beuch, U. 2010. Rostringar - svårt kvalitetsproblem kvar i jorden. Posterpresentation vid Borgeby fältdagar, Borgeby 30 juni 2010.

Internationella symposier, presentationer

Persson, P., 2008. Spraing in potatoes caused by tobacco rattle virus – how can molecular techniques help us solving the problem? ”Novel Technologies for Management of Beneficial and Harmful Microbes in the Root System. AB-RMS ” The 4th Baltic Sea Region Symposium and Postgraduate Course, Denmark Dec 2008, Univ of Copenhagen,

Persson, P., Färeby, L., Kvarnheden, A. & Beuch, U. 2010. ”Spraing in Swedish potatoproduction – Detection and Survey”. Presentation vid Mop-Top symposium i Helsingfors, Finland 17 februari 2009. Arrangör prof. Jari Valkonen, Helsingfors Universitet.

Vetenskaplig publikation

Santala, J. Samuilova, O., Hannukakala A., Latvala, S, Kortemaa, H., Beuch, U., Kvarnheden, A., **Persson, P.**, Bungaard-Topp, K., Örstad, K., Spetz, C., Nilsen, S.L., Kirk, H.G. et al., Valkonen, J.P.T. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne virus in northern Europe. *Annals of Applied Biology* 157, 163-178

Populärvetenskaplig publikation

Persson, P. 2008. Rostringar i potatis. *Viola, inlaga Potatis och Grönsaker*, 113 nr 24, p. 20