

# DETEKTION AV DVÄRGSKOTTVIRUS

Anders Kvarnheden  
Inst. för växtbiologi och skogsgenetik  
Sveriges lantbruksuniversitet  
Box 7080, 750 07 Uppsala

## SAMMANFATTNING

Dvärgskottsjukan är periodvis ansvarig för omfattande skador på havre. Sjukdomen har varit frånvarande i många år, men har nu återkommit. Inventeringar av dvärgskottsjuka är en viktig komponent i kontrollen av sjukdomen. I projektet har förbättrade diagnosmetoder (ELISA och RT-PCR) utvecklats för dvärgskottvirus (OSDV), både från växtmaterial och glasvingad ängsstrit som överför viruset. Metoderna har använts för att bestämma förekomsten av OSDV i havre och glasvingad ängsstrit. Inventeringar visar att viruset förekommer främst i skogsbygderna från Dalsland i sydväst till Hälsingland i nordost. Förekomsten av sjukdom varierar mellan åren, men även under år av inga inrapporterade fall går det att hitta OSDV-infekterade havreplantor. Sekvensanalyser av OSDV:s arvs massa visar att den genetiska variationen ser ut att vara liten, och analyserade isolat från olika år uppvisar 99% sekvensidentitet. Däremot skiljer den sig mycket från OSDV:s närmsta kända släktingar.

## BAKGRUND

### Introduktion

Dvärgskottsjuka har lokalt orsakat allvarliga skördeföruster i havre i olika delar av Europa. Sjukdomen orsakar symptom med dvärgväxt, och små förkrympta vippor. Stråets nedersta del blir förtjockad och plantorna får ett busklikat utseende. Ibland uppträder små karaktäristiska vårtliknande utväxter, s.k. enationer, på undersidan av bladen eller på strået (Lindsten 1970, Uyeda och Vacke 2004). Sjukdomen orsakas av ett virus, dvärgskottvirus (*Oat sterile dwarf virus*; OSDV), som överförs mellan växter främst av den glasvingade ängsstriten, *Javesella pellucida* (Průša 1958, Lindsten 1959). OSDV har en arvs massa som består av dubbelsträngat (ds)RNA (Luisoni *et al.* 1979) och tillhör släktet *Fijivirus* i familjen *Reoviridae* (Mertens *et al.* 2000). Familjen *Reoviridae* omfattar även många arter som uteslutande orsakar sjukdomar hos djur, inklusive människor. Till skillnad från de flesta virus som infekterar växter kan dvärgskottvirus och andra fijivirus också föröka sig i stritar. Den totala arvs massan hos fijivirus består av 10 komponenter av dsRNA (Mertens *et al.* 2000). RNA-sekvensen har bestämts för de fyra minsta komponenterna (segment 7, 8, 9 och 10) av ett svenskt OSDV-isolat (Isogai *et al.* 1998). OSDV infekterar växter inom familjen Poaceae, som t.ex. havre, korn, vete, rajgräs och ängsgröe, men infektionerna orsakar förutom i havre oftast svaga eller inga symptom (Lindsten *et al.* 1973). Nymferna av *J. pellucida* och fullbildade stritar är smittbärande från och med att de smittats och livet ut. Den glasvingade ängsstriten har i Skandinavien endast en generation per år (Raatikainen 1967). Virusbärande nymfer övervintrar i vallinsådd eller i oplöjda stråsådesfält och kan därifrån sprida virus till havre följande vår när de utvecklas till vingade individer (Lindsten och Waern 2002).

I Sverige har dvärgskottsjukan (även benämnd bollnässjuka) periodvis varit allmän spridd i södra Norrland och i stora delar av Svealand. Även i Götaland har det förekommit svåra angrepp (Lindsten 1970, Lindsten 1980, Lindsten och Waern 2002). Främst områden med intensiv vallodling har varit drabbade. Under 1962 var sjukdomen så allmän och stark att den hade en mycket kraftig effekt på havreskörden i Västernorrlands, Gävleborgs och Dalarnas län. År 1980 skedde utbredda virusangrepp, men senare under 1980- och 1990-talen rapporterades inga allvarliga utbrott av sjukdomen. Sjukdomen fanns ha ett klart samband

med vallinsådd i havre, eftersom både vektorer och virus övervintrar i fält med vallinsådd. Den huvudsakliga orsaken till minskningen var antagligen att man upphörde med havre som insåningsgröda, och istället t.ex. gjordes vallinsådd i korn som inte alls är lika känslig. De jordbrukare som drabbades av dvärgskottsjuka fick hålla upp med havreodling i 10-15 år.

År 2001 dök dvärgskottsjukan dock upp igen och har sedan dess förekommit regelbundet (Lindsten och Waern 2002, Andersson 2003, Andersson 2004, Kämmerling 2005, Kämmerling 2006). Från 2001 har dvärgskottsjukan konstaterats i Gävleborgs, Dalarnas, Örebro, Uppsala, Värmlands, Västmanlands och Östergötlands län. En inventering av ett 70-tal fält med ekologiskt odlad havre i Örebro län under 2003 visade att dvärgskottsjuka fanns i 23% av fälten (Andersson, 2003). Gävleborgs län hade den största förekomsten under 2004, och i ett fält i Hedesunda blev havren endast decimeterhög. År 2005 kvarstod problemet med dvärgskottsjuka och många havrefält i skogstrakterna mellan Örebro och Gävle var påverkade. En del fält har varit så drabbade att de inte har varit värda att skörda. Återkomsten är förknippad med att havreodlingen har ökat och att insådd av havre eller blandsäd i vall återkommit, speciellt på gårdar med ekologisk produktion. Tidigare undersökningar av havre som insåningsgröda under åren 1963-1967 visade att i medeltal 55,6% av stritarna var smittbärare (Lindsten 1970). Andra faktorer som påverkar grödan och stritarna, t.ex. temperatur, är troligen också viktiga för att bestämma sjukdomens omfattning. OSDV finns antagligen ständigt i gräsmarker och vallar samt i låg frekvens i sädesfält. Det kan på så sätt dröja sig kvar under långa perioder utan att vara synligt. Förändringar som gynnar virusspridning gör att det ibland dyker upp.

#### Tidigare resultat

Till skillnad från många andra växtvirus, som t.ex. vetedvärgvirus och rödsotvirus, finns det inget tillgängligt serologiskt test för dvärgskottvirus. Tidigare har man varit tvungen att göra överföringar med vektorn för att kunna bekräfta att plantorna är virusinfekterade (Lindsten 1970). Det har också saknats protokoll för att med molekylära metoder detektera och studera OSDV och andra fjivirus med dsRNA-genom. Inledande studier hade därför gjorts för att utveckla molekylära detektionsmetoder av OSDV i växter och stritar i form av ett examensarbete vid Inst. för entomologi och Inst. för växtbiologi och skogsgenetik (Svedling 2003). Virus-RNA kunde detekteras med hjälp av reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) i både växter och stritar. Hybridiseringsteknik användes för att bestämma förekomst av dvärgskottvirus i enskilda stritar. Tre stritpopulationer studerades och andelen virusbärande stritar fanns vara 13-30%. Intressant att notera var att OSDV återfanns i en population av *J. pellucida* vid en lokal där dvärgskottsjukan inte setts på flera år. Det visar att virusbärande stritar endast är en av de faktorer som är nödvändig för utbrott av dvärgskottsjuka.

En region av genomsegment 8 (709 bp) från två svenska isolat sekvensbestämdes och jämfördes med ett tidigare publicerat svenskt isolat (Isogai *et al.* 1998). Dessa tre isolat kommer alla från Lumsheden (gränsen Dalarnas/Gävleborgs län), men från olika år (1987, 1994 och 2002). Sekvensanalyserna visade att de tre isolaten är 99% identiska på nukleotidnivå och att de är mycket nära släkt. Det är alltså samma virusstam som återkommit de olika åren.

RT-PCR har sedan examensarbetets slutförande använts på utvalda prover för att bekräfta OSDV-infektion i fältprover från Örebro, Uppsala, Värmlands, Västmanlands och Gävleborgs län (Andersson 2003, Kämmerling 2005, Kämmerling 2006).

## MÅLSÄTTNING

Virusediagnostik i växter bygger ofta på symtom. För OSDV, liksom många andra sjukdomar, är symtomen emellertid inte helt distinkta utan kan lätt förväxlas med andra skadegörare eller abiotisk stress, som t.ex. torka (Lindsten och Waern 2002). Det finns t.ex. risk för att dvärgskottsjuka förväxlas med bestockningssjukan, som orsakas av det närbesläktade *Maize rough dwarf virus* (MRDV). Bestockningssjukan drabbar främst korn, men ger också liknande symtom som dvärgskottsjuka på havre (Lindsten *et al.* 1973). I de tidiga undersökningarna av OSDV har stritöverföringar använts för att bekräfta infektion med OSDV och för att bestämma andelen virusbärande stritar (Lindsten 1970). MRDV överförs med striten *Laodelphax striatellus* och alltså inte med samma vektor som OSDV.

Projektets huvudmål var att utveckla diagnosmetoder för dvärgskottvirus, både från växtmaterial och stritar, samt att bidra med analyser vid inventeringar av dvärgskottsjuka. RT-PCR och enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) anpassades för att kunna bestämma förekomst av OSDV i växtprover och stritar. För de flesta vanliga virussjukdomarna i växter kan infektion testas med hjälp av antikroppar och ELISA, som är en relativt billig och snabb metod (Hull 2002). Detta görs nu rutinmässigt för bl.a. vetedvärgvirus, rödsotvirus, potatisvirus Y, m.fl. Även för MRDV finns det kommersiella tester tillgängliga. Däremot har det saknats antiserum för OSDV. Vi utvecklade därför ett antiserum för OSDV som kan användas vid ELISA.

Odlingen av havre har ökat i den mellansvenska skogsbygden, och särskilt insådden av havre i vall på ekologiska gårdar. Potentiellt är dock dvärgskottsjuka ett hot mot havreodling i hela området, eftersom OSDV verkar vara allmänt spritt och det vid ogynnsamma förhållanden kan orsaka stora skador. De möjliga åtgärder som finns nu är kraftig besprutning för att få ned stritangrepp (ej möjligt i ekologisk odling) eller att helt enkelt upphöra med havreodling. Genom bättre diagnosmetoder och ökad kunskap om viruset och dess epidemiologi kan sjukdomen kontrolleras med metoder som missgynnar stritar och smittspridning. Detta skulle resultera i minskad insekticidanvändning i konventionellt jordbruk och ökade möjligheter för ekologisk odling.

## MATERIAL OCH METODER

### OSDV-detektion med reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Vetedvärgvirus har visats kunna detekteras genom PCR från homogeniserat växt- eller stritextrakt som inkuberats i PCR-rör (Kvarnheden *et al.* 2002, Ramsell *et al.* 2008). På liknande sätt användes denna teknik för att detektera OSDV med RT-PCR och OSDV-specifika primers (OSDV2 och OSDV3; Svedling 2003). Som negativ kontroll användes extrakt från friska havreplantor eller vatten. Växtmaterial samlades in i fält och analyserades direkt eller förvarades fryst (-20°C) till analystillfället. Växtproverna bestod i huvudsak av symptomatisk havre med grönskott. Infångade glasvingade ängsstritar förvarades i 70%-etanol till analystillfället.

### Kloning och sekvensanalys av yttre kapsidproteingenen för OSDV

Ett primerpar konstruerades och användes för att amplifiera hela den kodande regionen för yttre kapsidproteinet från RNA-segment 8 med hjälp av RT-PCR. En tidigare publicerad sekvens för ett svenskt isolat (Isogai *et al.* 1998) användes som utgångspunkt för primersekvensen. Ett tidigare identifierat OSDV-positivt prov av glasvingad ängsstrit (sammanslagning av 10 stritar) insamlat år 2006 i närheten av Lindesberg i Örebro län utnyttjades som utgångsmaterial. PCR-fragmentet av den förväntad storleken ca 1.8 kb renades, ligerades in i PCR-kloningsvektorn pGEM-T Easy (Promega) och skickades för

sekvensanalys (Macrogen). Två kloner sekvensbestämdes fullständigt i båda riktningar med hjälp av primers mot kloningsvektorn och virusspecifika primers. Sekvensanalyser utfördes med MegAlign (DNASTAR Lasergene 8.0).

#### Produktion av yttre kapsidprotein i *Escherichia coli*

Glutathione S-transferase (GST) gene fusion system (Amersham/GE Healthcare) användes för att producera kapsidproteinet i *Escherichia coli*. Plasmidvektorn pGEX-6P-3 innehåller en inducerbar promotor för uttryck av den klonade genen. Det uttryckta proteinet är rekombinant och innehåller en peptid-tag (GST) vilket innebär att det kan affinitetrenas med glutation samt också detekteras i western blot-analys med en GST-specifik antikropp. Genen för det yttre kapsidproteinet flyttades från pGEM-T Easy med *Bam*HI-klyvning till uttrycksvektorn pGEX-6P-3. Det rekombinanta proteinet uttrycktes och renades i huvudsak enligt de medföljande instruktionerna. För att klara av problem med proteinaggregering testades induktion av proteinuttryck vid olika temperaturer och +15°C fanns vara den mest lämpliga. Uttryck av rekombinant protein (95 kD) bekräftades med western blot-analys och GST-specifika antikroppar. Det producerade rekombinanta GST-kapsidproteinet renades från bakterieproteiner genom inkubation med glutation-sepharose och tvättar. Kapsidproteinet (72 kD) frigjordes från GST-taggen med proteasklyvning (PreScission Protease; Amersham/GE Healthcare). Storlek och renhet av producerade proteiner kontrollerades med separation genom SDS-PAGE minigelelektrofores (Bio-Rad Laboratories). Identiteten på det producerade rekombinanta proteinet bekräftades genom ”peptide mass fingerprinting”.

#### Produktion av antikroppar

Renat kapsidprotein skickades via kylfrakt till Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlingburg, Tyskland för produktion av antikroppar i samarbete med Dr. Frank Rabenstein. Två kaniner immuniserades där med OSDV-antigen och tappades på serum. Titern för antiserat bestämdes med plate trapped antibody-ELISA (PTA-ELISA). Renade IgG-antikroppar för OSDV, inklusive antikroppar konjugerade med alkaliskt fosfat, skickades sedan till Sverige. Antikropparnas specificitet testades genom western-blot analys med proteinextrakt från OSDV-infekterad havreplanta, frisk havreplanta och renat kapsidprotein producerat i *E.coli*.

#### ELISA-testning

DAS-ELISA med de framtagna OSDV-antikropparna utfördes i huvudsak som för vetedvärgvirus (Ramsell *et al.* 2008). Ett OSDV-infekterat fältprov av havre (Örebro län, 2009, positiv i RT-PCR) användes som positiv kontroll och en frisk havreplanta som negativ kontroll. För att undersöka metodens tillförlitlighet användes havreprover som samlats in i samband med RT-PCR-analyser åren 2003-2006. Dessutom analyserades prover av havre och rajgräs från Dalsland i samband med att ett fält påverkat av dvärgskottsjuka upptäckts under 2010.

#### Isolering av dubbelsträngat RNA

Dubbelsträngat RNA isolerades från en OSDV-positiv havreplanta (Örebro län, 2009) (Balijja *et al.* 2008). Genomsegmenten av dubbelsträngat RNA separerades i en agarosgel. RNA-extraktet användes för syntes av cDNA med slumpvisa primers. cDNA-strängarna fick hybridisera med varandra för att producera dubbelsträngat DNA och 3'-överhäng fylldes igen med Klenow. DNA:t klonades in i PCR-kloningsvektorn pJET1.2 (Fermentas). Kloner med större insert sekvensbestämdes (Macrogen) och translaterade sekvenser användes för sökning av proteindatabasen vid NCBI genom sökning med blastx.

## Samarbeten

Projektet har inneburit en rad samarbeten. Prover för analys har erhållits från: Ingall Kämmerling (Länsstyrelsen Örebro län), Peder Waern och Magnus Sandström (Växtskyddscentralen Uppsala), Håkan Wångstrand (Länsstyrelsen Uppsala län), Gunnel Wikander (Länsstyrelsen Västmanlands län), Åsa Terent (Länsstyrelsen Gävleborgs län), Hanna Johansson och Johan Jacobsson (Hushållningssällskapet Vänersborg) och Cecilia Lerenius (Växtskyddscentralen Skara). Lars Frykberg vid Inst. för mikrobiologi, SLU har bistått med handledning av produktion av kapsidprotein i *E. coli*. Åke Engström vid Inst. för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala universitet utförde ”peptide mass fingerprinting”. Produktion av antikroppar gjordes vid Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlingburg, Tyskland i samarbete med Frank Rabenstein.

## **RESULTAT**

### Bestämning av OSDV:s utbredning med RT-PCR

Dvärgskottsjukan drabbade även under 2007 havre i skogsbygderna och det var samtidigt även stora problem i Finland. En inventering av dvärgskottsjuka och förekomst av glasvingad ängsstrit utfördes 2007 i havrefält i Örebro, Västmanlands, Uppsala, Gävleborgs och Dalarnas län av länsstyrelser och Jordbruksverket (Kämmerling, 2008). Undersökningen omfattade ca 135 skiften med havre- och blandsäd, både konventionellt och ekologiskt odlad.

Symtomatiska plantor återfanns i ca 15% av fälten och i 5% av fälten bedömdes angreppen omfatta mer än enstaka plantor. Särskilt två fält i Heby kommun i västra Uppsala län hade starka angrepp av dvärgskottsjuka. Nymfer av glasvingad ängsstrit hittades i 46% av fälten, bortsett från Dalarnas län där inga nymfer återfanns. För att bekräfta OSDV-infektion i symtomatiska havreprover och testa OSDV-förekomst i glasvingad ängsstrit testade vi dessa med RT-PCR och virusspecifika primers. Genom testerna kunde förekomst av OSDV påvisas i strit- och havreprover från Uppsala, Västmanlands, Gävleborgs och Örebro län (Tabell 1). OSDV kunde t.ex. bekräftas i stritprover från ett havrefält nära Runhällen i nordvästra Uppsala län med missväxt. Även två prov av korn med dvärgsymtom erhöles från ett närbeläget fält, men de visade sig vara negativa. Intressant var också att OSDV identifierades i ett prov av havre från södra Örebro län, som annars inte drabbats av dvärgskottsjuka.

Tabell 1. Resultat av testning av prover tagna 2007 för OSDV med RT-PCR

| <u>Län</u>  | <u>Prov</u> | <u>Resultat</u> |
|-------------|-------------|-----------------|
| Gävleborg   |             |                 |
| Hedesunda   | Havre       | 3/5*            |
| Ljusdal     | Havre       | 1/2             |
| Ockelbo     | Havre       | 0/2             |
| Uppsala     | Strit       | 6/22            |
|             | Korn        | 0/2             |
| Västmanland |             |                 |
| Fält 10     | Strit       | 3/10            |
| Fält 11     | Strit       | 0/2             |
| Fält 33     | Strit       | 1/10            |
| Fält 36     | Strit       | 0/10            |
| Örebro      | Havre       | 1/4             |

\* Andel positiva prover

För 2008 och 2009 rapporterades inga fall av dvärgskottsjuka inom området för tidigare inventeringar. Det visar att liksom för många andra virussjukdomar så är det många faktorer

som ska samverka för sjukdomsutbrott. Tre prov från havreplantor med grönskott togs ändå 2009 från två skiften i norra Örebro län där dvärgskottsjuka förekommit under flera år. För två av plantorna misstänktes grönskotten bero på angrepp av fritfluga medan det för ett prov misstänktes rör sig om dvärgskottsjuka. Testning med RT-PCR visade att plantan med symtom av dvärgskottsjuka också var infekterad med OSDV medan de två andra plantorna var negativa för OSDV.

#### Amplifiering och kloning av genen för OSDV:s yttre kapsidprotein

Kapsidproteinet är oftast ansvarigt för immunreaktionen mot viruspartiklar (Hull 2002). Rekombinant kapsidprotein producerat i *E. coli* har visats vara ett bra alternativ istället för att använda renat virus vid antiserumproduktion (Hélias *et al.* 2003), eftersom det ibland kan vara svårt att få fram tillräckliga mängder intakt virus vid rening. Fijivirus har en komplex kapsidstruktur med två skal (Mertens *et al.* 2002). RT-PCR har tidigare använts för att amplifiera delar av OSDV genomsegment 8 som kodar för det yttre kapsidproteinet (Svedling 2003). Detta protein är det mest lämpliga för antiserumproduktion. Den fullständiga genen (1767 bp) för OSDV:s yttre kapsidprotein amplifierades med RT-PCR från ett stritprov från Örebro län insamlat 2006 och klonades. Sekvensbestämning av två positiva kloner visade att sekvensen var 1767 bp lång och kodade för det yttre kapsidproteinet för OSDV. Nukleotidsekvensen var nästan identisk (99%) med de tre tidigare analyserade svenska isolaten (Isogai *et al.* 1998, Svedling 2003) och skiljde sig endast på 2-3 positioner. Aminosyresekvensen var helt identisk med motsvarande partiella sekvenser som amplifierats tidigare (Svedling 2003) och skiljde sig med en aminosyra från den tidigare fullständiga sekvensen (Isogai *et al.* 1998). Isolaten från åren 1987, 2002 (Svedling 2003) och 2006 (detta projekt) har där ett metionin på position 244, medan isolatet från 1994 (Isogai *et al.* 1998) har ett treonin på motsvarande position.

#### Produktion och rening av OSDV:s yttre kapsidprotein

Den klonade kapsidgenen flyttades till en uttrycksvektor som möjliggör uttryck av rekombinant protein i *E. coli*. Det var först stora problem med att få kapsidproteinet uttryckt, men genom att sänka temperaturen för induktion av proteinproduktion till +15°C kunde ett protein av förväntad storlek produceras (95 kD, inklusive GST-tag). Den sänkta temperaturen förhindrade antagligen proteinaggregering. Att det rör sig om rätt protein som producerats bekräftades genom storleksbestämning, western blot-analys (bindning av antikropp till ”proteintag”) och ”mass peptide fingerprinting”. Kapsidproteinet frigjordes från GST-taggen med proteasklyvning, vilket kunde visas genom storleksseparation i en proteingel.

#### Produktion av antikroppar mot OSDV:s yttre kapsidprotein

Det renade yttre kapsidproteinet användes för att producera antikroppar mot OSDV i två kaniner. PTA-ELISA visade att immuniseringen var effektiv och att antikroppar mot kapsidproteinet erhållits. Western blot-analys med antikropparna gav tydligt positivt resultat för extrakt av infekterad havre, även när det späddes 1:10, medan extrakt från frisk havre var helt negativ.

#### Test av ELISA för OSDV

I DAS-ELISA kunde antikropparna specifikt detektera OSDV i infekterat havreprov, med en absorbans vid 405 nm på 3,8, medan negativa havreprover och buffertkontroll hade värden under 0,2 (ett typiskt resultat visas i Tabell 2).

Tabell 2 ELISA-test med positiva och negativa prover

| Prov             | Spädning            | Konc.      | Absorbans |
|------------------|---------------------|------------|-----------|
| OSDV-protein     | 1/1x10 <sup>5</sup> | 3,5 pg/μl  | 1,3       |
| OSDV-protein     | 1/1x10 <sup>6</sup> | 0,35 pg/μl | 0,3       |
| Infekterad havre | 1/1                 |            | 3,8       |
| Infekterad havre | 1/10                |            | 3,8       |
| Infekterad havre | 1/100               |            | 0,2       |
| Frisk havre      | 1/1                 |            | 0,15      |
| Frisk havre      | 1/10                |            | 0,15      |
| Buffert          |                     |            | 0,1       |

ELISA testades för prover som tidigare använts för RT-PCR vid inventeringar av dvärgskottsjuka under åren 2003-2006 och tydliga positiva värden erhöles för havre-extrakt som späts 1:20 (Tabell 3).

Tabell 3 ELISA-test med fältprover från 2003-2006

| Prov                | År   | Absorbans |
|---------------------|------|-----------|
| Örebro län 1        | 2003 | 3,9       |
| Örebro län 2        | 2003 | 0,8       |
| Örebro län 3        | 2003 | 3,9       |
| Örebro län 4        | 2003 | 4,0       |
| Örebro län 5        | 2003 | 0,2       |
| Örebro län 6        | 2006 | 3,7       |
| Örebro län 7        | 2006 | 3,8       |
| Örebro län 8        | 2006 | 1,4       |
| Gävleborgs län 1    | 2005 | >4        |
| Gävleborgs län 2    | 2005 | 2,2       |
| Gävleborgs län 3    | 2005 | 3,8       |
| Gävleborgs län 4    | 2005 | 3,8       |
| Östergötlands län 1 | 2004 | 0,2       |
| Östergötlands län 2 | 2004 | 0,2       |
| Buffert             |      | 0,1-0,2   |

Under 2010 observerades ett havrefält i Dalsland med misstänkta symtom på dvärgskottsjuka. Torkade symtomatiska blad testades från fjorton plantor och ett av dem var starkt positivt i ELISA ( $A_{405}=2,7$ ). RT-PCR-analys från samma prov gav också positivt resultat. Tre plantor från samma fält var svagt positiva i ELISA ( $A_{405}=0,5-0,6$ ), men RT-PCR-analys visade där negativt resultat. Antagligen var materialet i dessa tre prover inte tillräckligt bra för ELISA eller RT-PCR. Ytterligare 15 färska icke-symtomatiska prover av havre och 6 prover av rajgräs från Dalsland testades med ELISA, och var negativa.

#### Genomanalys av OSDV

Dubbelsträngat RNA för OSDV isolerades från ett havreprov enligt en nyligen utvecklad metod (Balijja *et al.* 2008). Det extraherade dubbelsträngade RNA:t separerades genom gelelektrofores och de 10 dubbelsträngade RNA-segmenten kunde då ses tydligt. Storlekarna på RNA-segmenten motsvarade de tidigare observerade för OSDV (Luisoni *et al.* 1979, Isogai *et al.* 1998). Endast de fyra minsta RNA-segmenten har tidigare sekvensbestämts för OSDV (Isogai *et al.* 1998) och cDNA producerades därför från det extraherade dubbelsträngade RNA:t följt av kloning. Sökningar av GenBank med erhållna nukleotidsekvenser gav inga signifikanta sekvenslikheter. Däremot visade translaterade

aminosyresekvenser signifikant likhet med proteiner från andra fijivirus. En preliminär analys av 14 kloner visade att de innehöll insert motsvarade RNA-segmenten 1, 3, 4 och 5 från *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV) med sekvensidentiteter på 25-54%.

### Genomförande

Projektmedel erhöles från SLF för detta projekt under 2007-2010. Medlen har använts för att anställa en forskningsassistent, Ingrid Eriksson, på deltid och för driftskostnader.

### **DISKUSSION**

I projekter har metoder utvecklats för detektion av OSDV, vilket har gjort det möjligt att på ett snabbt och enkelt sätt testa om ett prov innehåller viruset. Metoderna har utnyttjats för att analysera fältprover som misstänkts bära på OSDV. Inventeringen under 2007 kom till slutsatsen att skogsbygderna från västra Örebro län nordost mot Gävleborgs län i ett brett stråk är en potentiell riskzon för dvärgskottsjuka (Kämmerling 2008). Virus kunde i inventeringen bekräftas med RT-PCR i symtomatisk havre och i glasvingade ängsstritar från drabbade havrefält. Under de följande åren 2008-2010 rapporterades inga fall av dvärgskottsjuka i området. Detektionen av OSDV i ett enstaka symtomatiskt havreprov från Örebro län 2009 visar dock att viruset fortfarande finns kvar i området och att sjukdomen åter kan dyka upp om förhållandena är de rätta. På samma sätt upptäcktes ett enstaka havrefält med dvärgskottsjuka i Dalsland under 2010 och förekomsten av OSDV kunde påvisas både med ELISA och RT-PCR. Sjukdomen har tidigare funnits i Dalsland under 1970-talet (Gustafsson *et al.* 1976), men sjukdomen har sedan dess inte orsakat några problem. Med de nya analysmetoderna kommer det vara möjligt att följa sjukdomsutvecklingen i Västsverige.

Sekvensjämförelser för RNA-segment 8 från svenska isolat av OSDV från 1987, 1994, 2002 och 2006 visade att de nästan var identiska (99% sekvensidentitet). Det är alltså samma virusgenotyp som återkommer. Det gör bl.a. detektionen av viruset lättare.

ELISA för OSDV utvecklades efter att antiserum producerats mot OSDV:s yttre kapsidprotein. ELISA-testerna visar hög specificitet för OSDV och ELISA-resultaten kunde bekräftas med RT-PCR. Tillgången till ett bra antiserum kommer att i hög grad förenkla detektion av OSDV, särskilt för storskaliga undersökningar. Det kommer också vara möjligt att nu enkelt uttrycka mer protein i *E. coli* för framtida antiserumproduktion.

Extraherat dubbelsträngat RNA för OSDV användes för cDNA-syntes, kloning och sekvensanalyser. Preliminära sekvensanalyser av de största RNA-segmenten visar att dessa liksom de fyra minsta RNA-segmenten skiljer sig mycket från andra kända fijivirus. Fijivirus och andra reovirus har de största kända genomen bland växtvirus, men vi avser ändå att försöka sekvensbestämma hela genomet för att öka kunskapen om OSDV samt reovirus i allmänhet.

### **PUBLIKATIONER**

Resultaten av projektet håller nu på att sammanställas för två vetenskapliga publikationer i internationella review-granskade tidskrifter: en om utbredning och diversitet av OSDV samt en om utvecklandet av ELISA för OSDV. På sikt avses bestämningen av hela OSDV-genomet utföras, analyseras och publiceras internationellt. För spridning inom Sverige kommer resultaten sammanfattas i en artikel för Växtskyddsnotiser som på nytt har startats digitalt.



### Mötesabstracts (presentatör understruken)

Projektet och dess resultat har presenterats genom föredrag och posters vid flera internationella vetenskapliga möten:

- Kvarnheden A: Introduction to plant virology. Virus vector management in a changing climate, Nordic Association for Agricultural Scientists. Kristianstad 9/10-11/10 2007. (Muntligt föredrag)
- Kvarnheden A: Plant virus detection. Virus vector management in a changing climate, Nordic Association for Agricultural Scientists. Kristianstad 9/10-11/10 2007. (Muntligt föredrag)
- Ramsell JNE, Linnell A, Eriksson I, Holmblad J, Ekbom B, Kvarnheden A: Detection and molecular epidemiology of Oat sterile dwarf virus. Advances in Plant Virology. Harrogate, Storbritannien 1/4-3/4 2009. (Muntligt föredrag)
- Shad N, Nygren J, Eriksson I, Sigvald R, Westerbergh A, Kvarnheden A: Molecular epidemiology of viruses infecting cereals and grasses. NJF Seminar 430: Climate Change and Agricultural Production in the Baltic Sea Region. Uppsala, Sverige 4/5-6/5 2010. (Poster)
- Eriksson I, Ramsell JNE, Linnell A, Shad N, Holmblad J, Ekbom B, Frykberg L, Rabenstein F, Kvarnheden A: Detection and molecular epidemiology of *Oat sterile dwarf virus*. 11<sup>th</sup> International Plant Virus Epidemiology Symposium and 3<sup>rd</sup> Workshop of the Plant Virus Ecology Network. Ithaca, New York, USA 20/6-24/6 2010. (Poster)

### Projektet har bidragit med resultat till följande rapporter:

- Kämmerling I (2008) Dvärgskottsjuka i havre - Inventering 2007 i Örebro, Västmanlands, Uppsala, Gävleborgs och Dalarnas län. Publikation nr 2008:25; Länsstyrelsen i Örebro län. [http://www2.lansstyrelsen.se/orebro/SiteCollectionDocuments/sv/publikationer/2008/Publ\\_2008\\_25.pdf](http://www2.lansstyrelsen.se/orebro/SiteCollectionDocuments/sv/publikationer/2008/Publ_2008_25.pdf)
- Lerenius C, Mellqvist E, Bergh L (2010) Växtskyddsåret 2010 – Västergötland, Bohuslän, Dalsland och Värmland. Jordbruksverket 13 – 2010. <http://www.jordbruksverket.se/download/18.32b12c7f12940112a7c800038026/V%C3%A4xtskydds%C3%A5ret+2010+Skara.pdf>

### **ÖVRIG RESULTATFÖRMEDLING TILL NÄRINGEN**

Resultaten har vid virustestningar meddelats till länsstyrelser, hushållningssällskap och Jordbruksverket. De har i sin tur förmedlat resultaten till lantbrukare och andra intressenter vid direkta samtal, informationsmöten mm.

Projektet har också presenterats under föredrag vid växtskydds dagar som arrangerats i Uppsala av SLU för utomstående, särskilt rådgivare:

- Växtskydds dag, Uppsala, 15/3 2007. Kvarnheden A: Aktuellt om dvärgskottsjuka.
- Växtskydds dag, Uppsala, 27/3 2008. Kvarnheden A: Aktuella projekt beträffande virussjukdomar på stråsäd och potatis; Kvarnheden A: Diagnos av virussjukdomar.
- Växtskydds dag, Uppsala 30/3 2009. Kvarnheden A: Aktuella virussjukdomar på olika grödor.

Dvärgskottsjuka och det aktuella projektet har tagits upp på flera olika kurser vid SLU, Uppsala universitet och Estonian University of Life Sciences, bl.a. på kurser i växtpatologi, växtskydd och virologi för mark/växtagronomer, masterstudenter i växtbiologi och infektionsbiologi samt kandidatstudenter i bioteknologi.

### **REFERENSER**

Andersson I (2003) Dvärgskottsjuka i havre – en inventering av förekomsten i Örebro län

2003. *Länsstyrelsen i Örebro län* Publ. Nr 2003: 31
- Andersson I (2004) Dvärgskottsjuke i havre – inventering i Örebro län 2004. *Länsstyrelsen i Örebro län* Publ. Nr 2004: 49
- Balijja A, Kvarnheden A, Turchetti T (2008) A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods* 152: 32-37
- Gustafsson G, Nilsson I, Lindsten K (1976) Aktuella stritöverförbara viroser i Östergötland och Västsverige. *Växtskyddsnotiser* 40: 89-93
- Hélias V, Jacquot E, Guillet M, Le Hingrat Y, Giblot-Ducray D (2003) Production of recombinant *Potato mop-top virus* coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. *Journal of Virological Methods* 110: 91-97
- Hull R (2002) *Matthew's plant virology*. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc.
- Isogai M, Uyeda I, Lindsten K (1998) Taxonomic characteristics of fijiiviruses based on nucleotide sequences of the oat sterile dwarf virus genome. *Journal of General Virology* 79: 1479-1485
- Kvarnheden A, Lindblad M, Lindsten K, Valkonen JPT (2002) Genetic diversity of *Wheat dwarf virus*. *Archives of Virology* 147: 205-216
- Kämmerling I (2005) Dvärgskottsjuke i havre – Inventering i Örebro län 2005. *Länsstyrelsen i Örebro län* Publ. Nr 2005: 65
- Kämmerling I (2006) Dvärgskottsjuke i havre – Inventering i Värmlands, Örebro, Västmanlands, Uppsala, Gävleborgs och Dalarnas län 2006. *Länsstyrelsen i Örebro Län* Publ. Nr 2006: 62
- Lindsten K (1959) A preliminary report of virus diseases of cereals in Sweden. *Phytopatologische Zeitschrift* 35: 420-428
- Lindsten K (1970) Undersökningar av dvärgskottsjukans spridning och bekämpning. *Statens Växtskyddsanstalt – Meddelanden* 14: 403-446
- Lindsten K (1980) Är dvärgskottsjukan och andra stritöverförbara sjukdomar på väg att åter bli ett växtskyddsproblem? *Växtskyddsnotiser* 44: 121-127
- Lindsten K, Gerhardson B, Pettersson J (1973) Cereal tillering disease in Sweden and some comparisons with oat sterile dwarf and maize rough dwarf. *Statens Växtskyddsanstalt – Meddelanden* 15: 375-397
- Lindsten K, Waern P (2002) Dvärgskottsjuke. *Faktablad om Växtskydd (Jordbruk)* 21J
- Luisoni E, Boccardo G, Milne RG, Conti M (1979) Purification, serology and nucleic acid of oat sterile dwarf virus subviral particles. *Journal of General Virology* 45: 651-658
- Mertens PPC, Arella M, Attoui H, Belloncik S, Bergoin M, Boccardo G, Booth TF, Chiu W, Diprose JM, Duncan R, Estes MK *et al.* 2000. Family *Reoviridae*. I: van Regenmortel MVH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (editorer). *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc. s. 395-480
- Průša V (1958) Die sterile Verzweigung des Hafers in der Tschechoslowakischen Republik. *Phytopatologische Zeitschrift* 33: 99-107
- Raatikainen M (1967) Bionomics, enemies and population dynamics of *Javesella pellucida* (F.) (Hom., Delphacidae). *Annales Agriculturae Fenniae* 6, Supplement 2. 149 p.
- Ramsell JNE, Lemmetty A, Jonasson J, Andersson A, Sigvald R, Kvarnheden A (2008) Sequence analyses of *Wheat dwarf virus* isolates from different hosts reveal low genetic diversity within the wheat strain. *Plant Pathology* 57: 834-841
- Svedling A (2003) Oat sterile dwarf – A molecular method for determination of virus content in individual planthopper vectors. *Examensarbete, Institutionen för Entomologi, SLU*
- Uyeda I, Vacke J (2004) Oat sterile dwarf. I: Lapierre H och Signoret P-A (editorer). *Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. Paris, Frankrike: INRA Editions s. 495-498