

**Afprøvning af to metoder til detektion af
potato mop-top virus
i forædlingsmaterialet ved brug af potteforsøg**



Billede taget af forsøget ultimo maj.

December 2001

Birgitte A. B. Andersen

Kartoffelafgiftsfonds rapport

Introduktion

Projektet tager udgangspunkt i et af de store problemer i dansk kartoffelavl, rust. Rust frembringes af to virusser, potato mop-top virus (PMTV) og tobacco rattle virus, der har henholdsvis en svamp, *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (pulverskurv), og en nematod som vektor. Det er dog kun problematikken omkring PMTV og pulverskurv, der arbejdes med i dette projekt.

PMTV er et stort problem for dansk kartoffelavl, da der ikke er nogen mulighed for bekæmpelse af infektion med PMTV. Avlerne har derfor stor risiko for at købe inficeret læggemateriale og tillige sælge inficeret avl. At knoldene ikke viser rustsymptomer, er ikke ensbetydende med, at knoldene ikke er inficerede. Da PMTV ikke kan bekæmpes af PMTV, er den eneste mulighed for at undgå PMTV, at anvende resistente sorter. Men en stor del af de sorter, der dyrkes i dag, er ikke resistente overfor PMTV, hvilket giver et stort behov for nye sorter med resistens overfor PMTV. I forædlingsarbejdet er det derfor vigtigt, at have en metode, der giver rimelig sikre og sammenlignelige resultater årene imellem, for at fremme forædlingen mod sorter med resistens overfor PMTV.

I dag er den almindelige opfattelse, at sorter enten er modtagelige eller resistente overfor PMTV. Men sorter kan også være latent inficeret, således at sorter i stedet kan inddeles i følgende tre kategorier: modtagelige (PMTV er i knolden og der er visuelle symptomer), tolerante (PMTV er i knolden, men der er ingen visuelle symptomer) og resistente (PMTV virus er ikke i knolden og der er ingen visuelle symptomer). For at skelne mellem resistente og tolerante sorter, er det nødvendigt at bruge laboratorieanalyser. Det er dog ikke kendt, hvad det er, der fremprovokerer de visuelle symptomer i knoldene, om det er viruset selv, eller det er knoldens forsvarsmekanisme overfor viruset.

I forædlingsarbejdet bruges i dag markforsøg til test af nye sorters modtagelighed overfor PMTV. Resultaterne fra markforsøgene giver årene imellem svingende resultater, da smittetrykket af PMTV varierer i marken og mellem marker. I en pottetest er det muligt at tilnærme smittetrykket af PMTV samme niveau årene imellem, og resultaterne vil derfor være mere sikre. Pottetesten kan bruges til identifikation af nye forældre til brug i krydsningen og til test af forædlingsmaterialets modtagelighed overfor PMTV. Tillige vil resultaterne fra projektet kunne bruges i forbindelse med et EU-projekt, med planlagt start foråret 2002, der omhandler pulverskurv og tildels PMTV.

Formålet med projektet er at finde en pottemetode, hvor det er muligt at inficere knolde med PMTV. Samt at undersøge, om resultaterne af pottetesten er i overensstemmelse med allerede kendte sorters modtagelighed overfor PMTV. Projektet strækker sig over en vækstsæson, med start forår 2001 og slut efterår 2001.

Materiale & metode

PMTV-smitte, skræl

Knolde indsamlet med visuelle symptomer for infektion med PMTV og pulverskurv skrælles. Skrællen lufttørres og knuses derefter til et pulver.

PMTV-smitte, jord

Spagnum fra forsøg, hvor det efter høst viste sig, at knolde var inficeret med PMTV og pulverskurv.

Sorter

Der blev anvendt 60 meristemknolde af størrelsen 15-25 mm., af følgende sorter til forsøget, inddelt efter modtagelighed efter Nielsen & Mølgaard (1996):

Modtagelighed	Sorter
Meget modtagelig	Hansa, Primula, Saturna
Moderat modtagelig	Berber, Folva*, Jutlandia, Sieglinde
Svagt modtagelig	Fakse, Kennebec, Spunta*, Ukama
Ikke modtagelig	Binthe, Oleva, Hamlet

* Af sorterne Folva og Spunta, var det kun muligt af få 30 meristemknolde.

Der blev lavet to sideløbende forsøg:

- smitte med PMTV og pulverskurv fra skræl.
- smitte med PMTV og pulverskurv fra jord.

I de to forsøg var der 15 gentagelser af hver sort, dette gjaldt dog ikke for Folva og Spunta. Forsøgene blev lagt to gange med 14 dage mellemrum. Denne forskydning gjorde sig tillige gældende for høst og opgørelse af infektion med pulverskurv og PMTV. Forsøgene var placeret udendørs på plan jord, hvor hver forsøg stilles i en ramme på plastik og filtmåtte, se billede på forsiden.

Potterne, med en diameter på 13 cm., fyldtes halvt med steril spagnum, smitstoffet blev fordelt jævnt over spagnumet og potterne fyldes derefter op med steril spagnum, til sidst blev knoldene lagt 2/3 ned i potterne. Der blev brugt 0,35g. knust skræl med PMTV-smitte, og 3,50g. jord med PMTV-smitte til at inficere potterne med. Beregning af mængden af skræl, der skulle bruges blev gjort ud fra forsøg lavet af Wastie (1991) med smitte af kartofler med inficeret skræl i bede. Det var ikke muligt at bestemme sporemængden i den inficerede jord, der blev brugt til at smitning. Men ud fra antagelsen om, at koncentrationen i jord var væsentlig mindre end i skræl, blev der brugt 10x så meget jord som skræl. Forsøget blev gødet med en langsomtvirkende gødning (Osmocote, Scotts Europe B. W., NL), ca. 0,140g/m³ pr gentagelse for hver af de to smittemetoder. Det var muligt at vande forsøgene i tørre perioder af vækstsæsonen.

Ved varsling om skimmel blev der sprøjtet med Shirlan iblandet Sumi Alfa mod tægeangreb. Denne sprøjtning blev foretaget to gange, med tre ugers mellemrum. Desuden blev foretaget en sprøjtning med Tattoo mod skimmel, en uge efter første sprøjtning med Shirlan og Sumi Alfa.

Forsøgene blev lagt henholdsvis 1. maj og 14. maj 2001. Planlagt vækstperiode var 3½ måned, men da kartoflerne visnede ned efter tre måneder blev de høstet henholdsvis 2. august og 16. august. Knoldene stod efter høst fem dage og hærdede inden angreb af pulverskurv blev opgjort, hvorefter de blev stillet på køl ved 4° C. Efter tre uger ved 4° C, blev knoldene sat et døgn ved ca. 20° C, og derefter en uge ved 8° C. Efter i alt fire uger på lager blev knoldene undersøgt for visuelle symptomer på infektion med PMTV, ekstern og intern i knoldene. De knolde der indeholdt visuelle symptomer blev derefter testet ved ELISA, hvor der blev lavet dobbeltbestemmelser, for med sikkerhed at fastslå, at de visuelle symptomer var fremkommet som følge af infektion med PMTV. Desuden blev udvalgte knolde, uden visuelle symptomer for infektion med PMTV, testet ved ELISA.

Der blev anvendt DAS-ELISA til analyserne, baseret på en standard procedure efter Clark & Adams (1977).

Resultater

Der spirede knolde i alle potter, på nær én, i anden gentagelse smitte med jord. Selvom der var knolde i de resterende potter, var der i nogle potter ikke så store knolde, at de blev talt med ved høst. Desuden var alle knolde i nogle potter rådne. I dette afsnit lægges først vægt på de samlede resultater for de to smittemetoder, derefter ses på resultaterne for sorterne.

Resultater for de to smittemetoder

Ved optagning blev angreb af pulverskurv opgjort, med karakteren 9 for knolde uden angreb og karakteren 1 for knolde meget kraftig angrebet. Angrebsgraden lå i alle fire forsøg med et gennemsnit mellem 8 og 8,5, se tabel 1. Der var i begge gentagelser af forsøgene tendens til, at de to forsøg smittet med skræl var kraftigere angrebet. Det var dog kun en karakterforskel på 0,3 i forholdet mellem smitte med skræl og smitte med jord. For de enkelte knolde var der større variation i infektionsgraden, således lå karaktererne mellem 5 og 9, dog med fleste på 8 eller 9.

Tabel 1. Infektion af pulverskurv opgjort som gennemsnit i hver af de fire forsøg.

Forsøg	Angrebskarakteren for pulverskurv, angivet som gennemsnit af hvert forsøg.
1. gentagelse skræl	8,2
1. gentagelse jord	8,5
2. gentagelse skræl	8,0
2. gentagelse jord	8,3

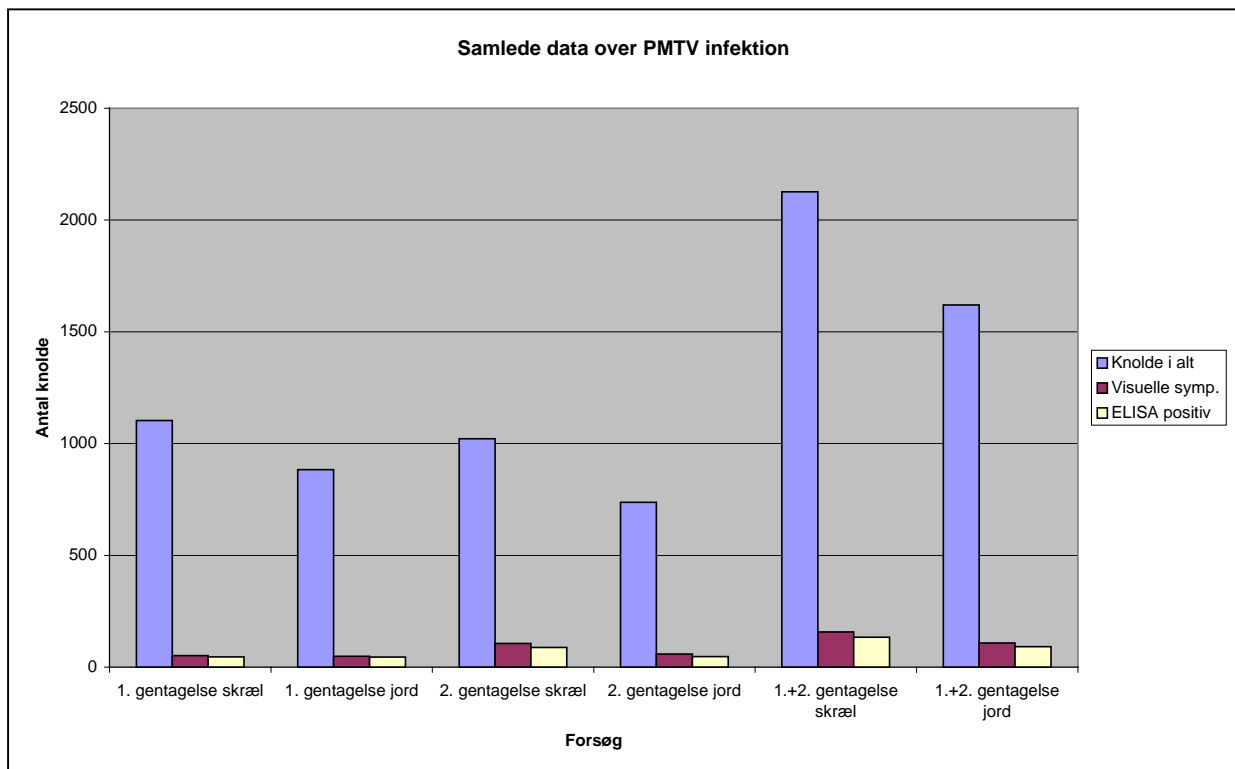
Forekomsten af eksterne visuelle symptomer for infektion med PMTV ved optagning, var begrænset til ganske få knolde i anden gentagelse, både i forsøgene smitte med skræl og jord. Efter lagring var der derimod en større forekomst af eksterne visuelle symptomer. Efter gennemskæring af knoldene blev der tillige fundet få knolde kun med interne symptomer. Der var for begge smittemetoder flere knolde med visuelle symptomer i anden gentagelse. I forsøgene smittet med skræl var der 52 og 106 knolde med visuelle symptomer i henholdsvis første og anden gentagelse. Ved smitte med jord var der derimod ikke den samme forskel på antallet af knolde med visuelle symptomer i de to gentagelser, således var der 49 og 59 knolde med symptomer i henholdsvis første og anden gentagelse.

Resultaterne fra ELISA bekræftede at de visuelle symptomer skyldes infektion med PMTV, dog var der i alle fire forsøg færre positive. Dertil kom knolde, hvor resultaterne fra ELISA ikke var helt høje nok, til at blive talt med som positive, men der var forhøjede værdier, hvilket tyder på lav koncentration af PMTV i knoldene. Resultaterne fra ELISA ses i tabel 2, hvor forskellen mellem antallet af knolde med visuelle symptomer og antal knolde positive ved ELISA kan ses. Der blev ikke fundet PMTV i de knolde, uden visuelle symptomer, der blev testet ved ELISA.

Tabel 2. Antal knolde inficeret med PMTV, fordelt på forsøg.

Forsøg	Antal knolde med visuelle symptomer	Antal knolde positiv ved ELISA
1. gentagelse skræl	52	46
1. gentagelse jord	49	45
2. gentagelse skræl	106	88
2. gentagelse jord	59	47

I figur 1 ses resultaterne over infektion med PMTV opstillet for de fire forsøg, tillige samlede resultater for hver af de to smittemetoder. Der ses stor forskel på antallet af knolde, der blev høstet, ved sammenligning af de to smittemetoder, hvor der er langt flere ved smitte med skræl end ved smitte med jord. Men når der i stedet fokuseres på antal inficeret med PMTV, er der ikke nær den samme forskel, dog er der stadig flest ved smitte med skræl.



Figur 1. Oversigt over antal knolde, visuelle symptomer og PMTV fundet ved ELISA fordelt på de fire forsøg, samt det samlede resultat af de to gentagelser smittet med henholdsvis skræl og jord samlet.

Der var stor forskel mellem udbytte af forsøgene, alt efter, om de var smittet med skræl eller jord. I forsøgene smittet med skræl lå det samlede udbytte for hver af de to gentagelser på henholdsvis 1104 og 1022 knolde pr. gentagelse. For forsøgene smittet med jord lå udbytte for de to gentagelser derimod noget lavere, på henholdsvis 883 og 737 knolde pr. gentagelse. Antallet af rådne knolde var ikke medregnet, men i forsøgene smittet med jord var antallet af rådne knolde langt større end i forsøgene smittet med skræl. Således var antallet af rådne

knolde henholdsvis 29 og 30 for de to gentagelser smittet med skræl i forhold til henholdsvis 78 og 159 for de to gentagelser smittet med jord.

Resultater for sorterne

Det var ikke muligt at finde nogen sammenhæng mellem antal inficerede knolde med PMTV og karakteren for pulverskurvangreb i de enkelte sorter. Men generelt var der ikke kraftig angreb af pulverskurv i nogen af sorterne. I tabel 3 ses, at Primula i forsøget smittet med skræl havde 53 knolde inficeret med PMTV og en pulverskurvkarakter på 8,0. Til sammenligning havde Saturna kun én knold inficeret med PMTV, men pulverskurvkarakteren var også 8,0. I forsøget smittet med jord, havde Jutlandia 58 knolde inficeret med PMTV, og en pulverskurvkarakter på 8,6. Berber derimod havde en pulverskurvkarakter på 8,1, men ingen knolde inficeret med PMTV.

Tabel 3. Resultater fra pottforsøgene fordelt på sorter og smittemetode.

Modtagelighed	Sort	Smitte med skræl				Smitte med jord			
		1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*
Meget modtagelige	Saturna	2	1	0,7	8,0	3	1	0,8	8,6
	Primula	62	53	32,5	8,0	12	10	10,0	8,2
	Hansa	1	1	0,4	8,4	0	0	0,0	8,7
Moderat modtagelige	Sieglinde	6	6	4,2	8,2	0	0	0,0	8,5
	Jutlandia	59	49	31,4	8,4	67	58	42,6	8,6
	Berber	0	0	0,0	7,6	0	0	0,0	8,1
	Folva	4	3	3,5	8,4	7	6	11,3	8,6
Svagt modtagelige	Ukama	0	0	0,0	7,6	1	0	0,0	8,2
	Kennebec	1	1	0,9	7,1	2	2	2,3	8,3
	Fakse	11	8	5,2	8,5	3	3	2,6	8,8
	Spunta	1	1	1,6	8,3	0	0	0,0	8,6
Ikke modtagelige	Bintje	0	0	0,0	7,9	0	0	0,0	8,3
	Oleva	8	8	5,1	8,3	9	8	6,3	8,4
	Hamlet	3	3	1,6	8,1	4	4	2,6	8,0

*: 1: antal knolde med visuelle symptomer for infektion med PMTV. 2: Antal knolde med PMTV ved ELISA. 3: % knolde inficeret med PMTV, ud fra resultaterne fra ELISA. 4: Gennemsnitskarakter for pulverskurvangreb.

Infektionen af PMTV fordelt på sorter og smittemetode ses i tabel 3, hvor det hovedsagelig er sorterne Primula og Jutlandia, der blev inficeret med PMTV, ved begge smittemetoder. Det var dog kun i sorterne Berber, Ukama og Bintje ved smitte med skræl, hvor ingen knolde blev fundet inficeret med PMTV. Ved smitte med jord, var det ligeledes de førnævnte sorter tillige med Hansa, Sieglinde og Spunta, hvor der ikke blev fundet infektion med PMTV. Som det ses ud fra tabel 3, var det ikke alle de knolde, hvori der blev fundet visuelle symptomer for infektion med PMTV, hvor det var muligt af påvist infektion med ELISA. Forskellen mellem antal knolde med

visuelle symptomer og antal positive ved ELISA er omkring 15%, både for smitte med skræl og jord.

Diskussion.

Formålet med at finde en pottemetode, hvor det er muligt at inficere knolde med PMTV er lykkedes. Men det var ikke muligt på et år, at få realistiske resultater i forhold til allerede kendte sorter modtagelighed.

Diskussion for de to smittemetoder

Indholdet af pulverskurv og PMTV i de to smittemetoder er ikke kendt, dog blev en prøve af det knuste skræl sendt til Danmarks JordbrugsForskning, Flakkebjerg, hvor der blev fundet PMTV i prøven. Tillige blev der udtaget prøver fra det knuste skræl og spagnumet, der blev undersøgt ved mikroskopi, for at sikre, at det indeholdt sporer af pulverskurv. Det er muligt at få en værdi for indholdet af PMTV i smitstoffet, men det vil være svært, at have nøjagtigt det samme indhold af PMTV i smitstoffet hvert år. Dette er antagelig heller ikke nødvendigt, blot der er sikkerhed for, at der er PMTV i smitstoffet.

Antallet af rådne knolde i forsøget, skyldes tildels, at det kun var muligt at styre vandingen i tørre perioder, da forsøgene stod udendørs, hvilket i perioder med megen nedbør gav kraftig overvanding. En anden ting, der kan have spillet ind, er indholdet af andre sygdomme i smittematerialet. Dette kan således være grund til den store forskel på forekomst af råd ved de to smittemetoder, hvor smitte med jord ved begge gentagelser gav langt flere knolde med råd. Således var der i anden gentagelse over fem gange så mange knolde med råd ved smitte med jord, end ved smitte med skræl.

Diskussion for sorterne

Det er ikke muligt at finde nogen sammenhæng mellem antal knolde inficeret med PMTV og pulverskurvkaraktern. Dette passer meget godt sammen med det kendskab der er i dag, hvor der i Danmark kun er få problemer med pulverskurv, men store problemer med PMTV. Derimod er der problemer med pulverskurv, længere nedad i Europa, men kun få problemer med PMTV.

At der ikke blev fundet flere knolde med infektion af PMTV kan have flere årsager. I forsøget var det hovedsagelig kun de knolde der viste symptomer for infektion, der blev testet. Knolde kan imidlertid være latent inficeret, uden at vise symptomer for infektion, derfor kan der have været flere inficerede knolde, end de registrerede. Dog blev der medtaget knolde uden visuelle

symptomer i ELISA'en, hvor det ikke lykkedes at påvise PMTV. Knoldene lå på lager én måned, hvor de blev udsat for temperatursvingninger, inden de blev undersøgt. Havde temperatursvingningerne været anderledes, er det muligt, at der ville være flere knolde med visuelle symptomer for infektion med PMTV. I tabel 3, hvor infektionen af PMTV er opgjort efter sorter, var det forventet, at der ville have været flest positive i de øverste på listen, da disse er mest modtagelige. I stedet var det Jutlandia, der sammenlagt havde flest inficerede knolde, selvom den kun er grupperet under moderat modtagelig. Denne forskel fra det forventede resultat, kan bl.a. skyldes en eventuel forskel på isolater af PMTV, hvor sortsresistensen kan være forskellig over for de forskellige isolater. At der blev fundet infektion med PMTV i sorterne Hamlet og Oleva, som var medtaget som resistente sorter, kan ligeledes have noget at gøre med forskelle på isolater af PMTV. Således kan der ligge andre isolater til grund for den klassificering Nielsen & Mølgaard (1996) lavede, end der er brugt i dette projekt. At det ikke var muligt at påvise infektion med PMTV ved ELISA, i alle de knolde hvori der blev fundet visuelle symptomer, kan skyldes, at indholdet af PMTV i knoldene har været meget lavt. I tilfælde af meget lavt indhold af PMTV i knoldene, er det ikke altid muligt af eftervise infektionen ved ELISA, i så tilfælde, skal der bruges en mere følsom analysemetode, som PCR.

Opsummering

Når der i figur 1 ses på det samlede resultat for de to gentagelser for henholdsvis skræl og jord, er antallet af knolde med visuelle symptomer i forhold til det totale antal knolde meget lig hinanden for de to smittemetoder. Den samme sammenhæng gælder for resultaterne fra ELISA og det totale knoldantal. Ud fra disse tal alene, vil opsummeringen af projektet være, at begge metoder til smitte er velegnede. Men ved at medtage en parameter mere, nemlig antallet af rådne knolde i forsøgene ses det, at smitte med skræl kun gav en fjerdedel af de rådne knolde som smitte med jord gav. Desuden var der tendens til kraftigere angreb af pulverskurv ved smitte med skræl end smitte med jord. Ved at medtage disse to parametre også, er opsummeringen på projektet, at metoden med brug af skræl som smittemateriale er mest velegnet, det er dog ikke muligt at komme med nogen egentlig konklusion, da projektet kun var over en vækstsæson.

Eftersom det var første år, metoderne blev afprøvet, er der flere ting, der kunne ændres, for at få bedre resultater. Det vil således være bedre at have forsøget et sted, hvor det kan være overdækket, da der var store problemer med for meget regn i perioder. Dette samt tilførsel af mere gødning, vil kunne afhjælpe den tidlige nedvisning. Derudover vil større pletter også være at foretrække, da dette vil kunne afhjælpe de ofte små knolde i pletterne og tillige vil vandingen være lettere at styre. Ved at optimere de temperatursvingninger, som knoldene bliver udsat for under lagring, vil det måske være muligt, at få flere knolde med visuelle symptomer for infektion med PMTV. Indsamling af knolde fra flere forskellige lokaliteter i forbindelse med indsamling

af smitte til pottemetoden med brug af skræl, og sørge for at blande det knuste skræl godt. Gøre det muligt, at udsætte kartoflerne i forsøget for flere isolater på en gang, og dermed give en større sikkerhed for, at resultatet holder i praksis.

Referencer

Clark, M. F. & N. A. Adams, 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, pp. 475-483.

Nielsen S.L. & Mølgaard, J.P., 1996: Rust i kartofler. *Grøn Viden* nr. 177, pp. 1-8.

Wastie, R.L., 1991: Resistance to powdery scab of seedling progenies of *Solanum tuberosum*. *Potato Research* 34, pp. 249-252.