

Diagnostiek aardappelvirusen in pootgoed

Kris De Jonghe
01/02/201

Algemeen - virusbeheersing in aardappelpootgoed

Focus ligt op de beheersing van belangrijke, door bladluis overgedragen virussen

Vermeerdering van de **eerste generaties pootgoed** vraagt een **strikte aanpak** in de beheersing van deze virussen

DOEL IS INFECTIE VERHINDEREN

Er zijn **2 groepen bladluis-overdraagbare virussen** die van belang zijn in aardappelpootgoed:

persistent overgedragen virussen

voorbeeld

PLRV - aardappelbladrolvirus

niet-persistent overgedragen virussen

voorbeeld

PVY – aardappelvirus Y

PVA – aardappelvirus A



Algemeen - virusbeheersing in aardappelpootgoed

persistent overgedragen virussen (PLRV)

- Virussen in het floëem
- Bladluizen zuigen geïnfecteerd sap
- De virusdeeltjes moeten door het verteringssysteem van de bladluis naar de speekselklieren.
- Beperkt tot typische aardappelbladluizen
- Pas dan (na meerdere uren) is de vector infectieus
- Vector blijft zijn hele leven infectieus



niet-persistent overgedragen virussen (PVY, PVA)

- Virussen in de meeste plantendelen verspreid (incl. epidermis)
- Snelle opname en direct terug afgave mogelijk via de monddelen van de bladluis (in luttele minuten is overdracht mogelijk)
- Overdracht ook door gevleugelde bladluizen die kort “proeven” op zoek naar geschikte waardplant.

Algemeen - virusbeheersing in aardappelpootgoed

Variëteitsafhankelijke virussymptomen

- Term: “Varietal propensity” (SASA, Schotland)
- Duidt de ernst van de symptomen aan in vergelijking tot het gemiddelde
- Kan gebruikt worden om het bestrijdingsprogramma:

➤ **Bladluisbestrijding** (aanpassen aan de gevoeligheid)

➤ **Aanplantingsstrategie** (vb. gevoelige rassen verder weg van mogelijke virusbronnen)

Getal >1 grotere kans op virusinfectie in deze variëteit

Getal <1 lagere kans op virusaantasting in deze variëteit

Variety	Crops	Mosaics	PVY ^N	PVY ^{DC}	PVA	PVV	Leafroll
HERMES	1771	0.5	0.1	0.6	1.8	0.0	0.3
MARIS PIPER	1746	1.7	1.7	1.0	0.1	0.0	4.4
DESIREE	1031	2.0	1.1	1.2	5.9	0.0	1.4
MARIS PEER	714	2.2	2.4	2.9	0.3	0.0	0.5
ESTIMA	592	1.1	0.2	0.8	5.4	26.4	1.5
MARKIES	426	0.3	0.1	0.0	1.5	0.0	0.4
KING EDWARD	395	2.3	4.7	3.2	0.2	0.0	1.5
MARFONA	363	0.9	1.2	2.2	0.2	0.0	1.0
PENTLAND DELL	357	0.5	0.9	0.0	0.3	0.0	1.1
CABARET	331	1.1	1.3	1.4	4.9	0.0	0.5
LADY ROSETTA	330	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
SAXON	323	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.2
VALOR	314	3.8	2.7	4.0	0.0	0.0	0.9
ATLANTIC	296	1.9	4.4	4.2	0.3	0.0	0.2
CHARLOTTE	288	1.1	1.7	2.2	0.0	0.0	0.2
CARA	280	0.5	0.5	0.6	0.0	0.0	1.4
WINSTON	274	2.3	0.8	5.7	0.0	0.0	0.8
HARMONY	269	2.3	2.0	0.6	0.0	0.0	1.1
SATURNA	255	0.5	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0
BURREN	250	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.5
ROOSTER	224	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.5
RUSSET BURBANK	222	1.0	0.4	0.7	2.0	0.0	2.1
MARIS BARD	221	0.6	0.9	0.7	2.4	0.0	0.3
KERR'S PINK	205	0.9	0.5	0.8	0.0	0.0	1.7
VALES SOVEREIGN	194	0.5	0.3	0.8	1.4	0.0	3.0
WILJA	173	1.5	1.9	0.9	0.0	0.0	0.3
KENNEBEC	170	0.1	0.0	0.0	0.5	0.0	0.3
SLANEY	161	2.0	3.3	1.0	0.0	0.0	2.2
MELODY	156	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PREMIERE	154	0.3	0.1	0.0	0.0	5.3	0.0
FONTANE	145	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.4
NICOLA	139	1.4	1.3	0.0	0.6	0.0	0.8
SHEPODY	131	1.2	1.0	2.4	0.0	0.0	0.4

Aardappelvirus Y (PVY)

belangrijkste karakteristieken



- *Potato virus Y*

Potyviridae familie – typespecies van het Potyvirus genus
filamenteuze en flexibele partikels (700nm x 11 nm)

- **Genoom**

Positief ssRNA van ± 10 Kb
Codeert voor 9 virale eiwitten



- **Vectoren**

Niet persistente overdracht door minstens
70 bladluisoorten
(incl. de groene perzikluis *Myzus persicae*)



- **Waardplantbereik**

> 500 plantensoorten



- **Economisch belang**

Zware opbrengstverliezen (>50%) mogelijk



Aardappelvirus Y overdracht



- PVY opname binnen de 15-30s (niet-persistent)
- PVY afgifte aan de gezonde plant binnen de 5-30s
- PVY deeltjes binden in de stylet van de bladluis
- Chemische controle niet effectief: afdoden duurt langer dan de transmissie
- De bladluis verliest zijn infectiviteit snel (na 1-2 voedingsbeurten)

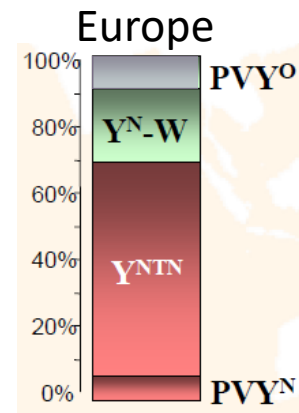
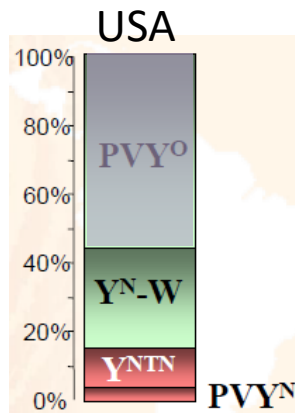
Aardappelvirus Y symptomen

- Sterke symptoomvariatie tussen de stammen - PVY^{Wi} vs. PVY^O
- Sterke variatie in PVY symptoomvorming tussen de aardappel cultivars, bijv. Shepody (“tijdelijke” symptomen)
- Slechts enkele stammen (NTN, NA, NWi) veroorzaken symptomen op knollen – “potato tuber necrotic ringspot disease”

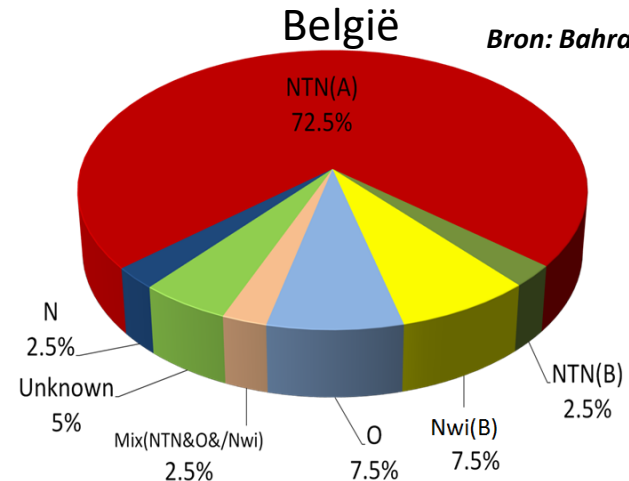


Aardappelvirus Y Wilga in opmars

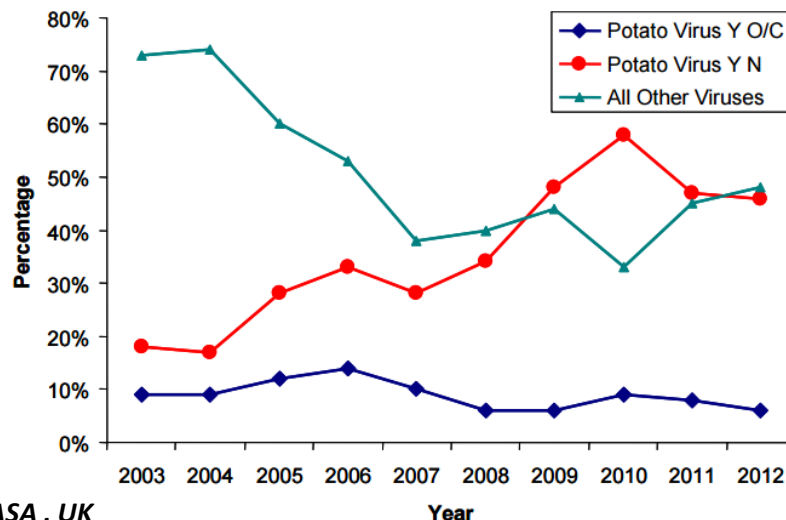
- Sedert 1984 eerste beschrijving van de Wilga recombinant in Polen.
- Sindsdien geleidelijk aan belang gewonnen.
- NTN en N-Wilga in Europa belangrijkste stammen.



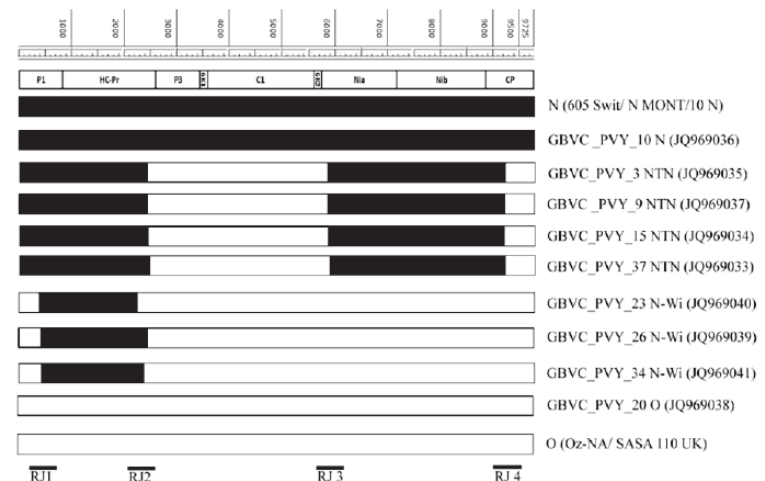
Bron: FN3PT, Frankrijk



Bron: Bahrami et al. 2014

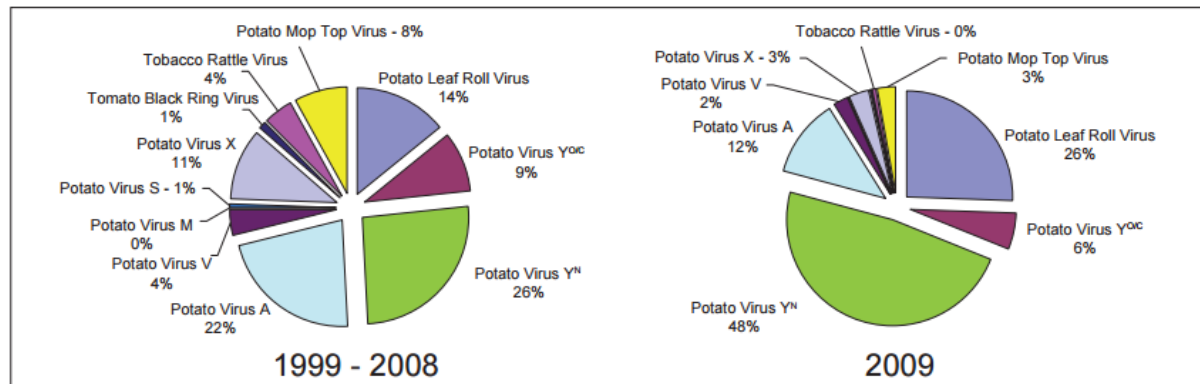


Bron: SASA, UK



Aardappelvirus Y Wilga – mogelijke problemen voor de certificering

- PVY wint algemeen aan belang tov. andere virussen in aardappel



Bron: Incidence of viruses in the Scottish Potato Certification Scheme (SPCS) ; C. Lacomme

- Wilga lijkt selectief voordeel te hebben in de verspreiding en overleving.

Aandachtspunten {

- Cultivargevoeligheid (vnl. symptomen) ?
- Late aantastingen in het seizoen ?
- Overdrachtsefficiëntie ?
- Misleidende laboresultaten: diagnostiek op stamniveau nodig ?, enz.

- Foute veldwaarnemingen door beperkte/geen symptoomvorming.

➡ Moeilijker virusmanagement

(zowel pootgoed, consumptie als verwerking)

PVY – stammenverschuiving



[Journal of Plant Diseases and Protection](#)

June 2015, Volume 122, [Issue 3](#), pp 109–119 | [Cite as](#)

Potato virus Y (PVY) in Seed Potato Certification

Authors

[Authors and affiliations](#)

Kerstin Lindner , Friedhilde Trautwein, Adolf Kellermann, Gerda Bauch

Verband “ernstig virus”
en symptoomvorming
valt weg



severity. Historically all severe viruses were usually the origin of severe virus diseases, and mild viruses, in general, were seen to cause mild diseases. However, the situation has changed, especially for the most economically important virus, *Potato virus Y (PVY)*, which is considered a severe virus. Investigation of PVY-infected potato leaf samples from Bavarian potato seed certification found that the “classical” O and the N strains, predominantly responsible for severe virus diseases, represented less than 1% of the infections present. Ca. 99% of the PVY infections were comprised of the new recombinant strains PVY^{NTN} and PVY^{NW}. The ratio between these recombinants differed substantially. Differences in susceptibility of particular cultivars to certain PVY strains seem to be one reason for that. Therefore, the ratio of the recombinants may depend upon which cultivars are favoured in different potato growing areas or countries.

PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Wanneer testen en op welke matrix

1. Direct op knol
 - Invloed van de bewaring
 - Invloed van het deelmonster
2. Na opkweek en op blad

Effect van het poolen op de resultaten

1. Poolgrootte en kans op valse negatieven
2. Percentages

PVY – virusdetectie

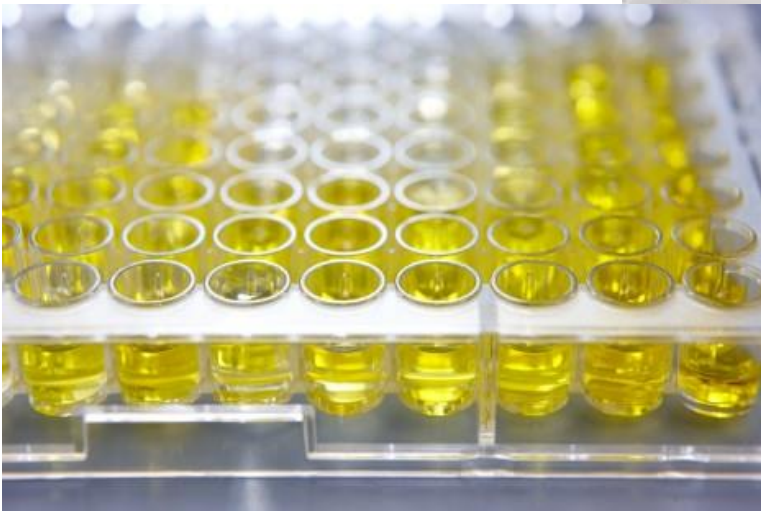
Welke test ?

1. Serologische detectie

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

2. Detectie op basis van genetisch materiaal

- RT-PCR
- Real-time PCR
- HTS



PVY – virusdetectie

Welke test ?

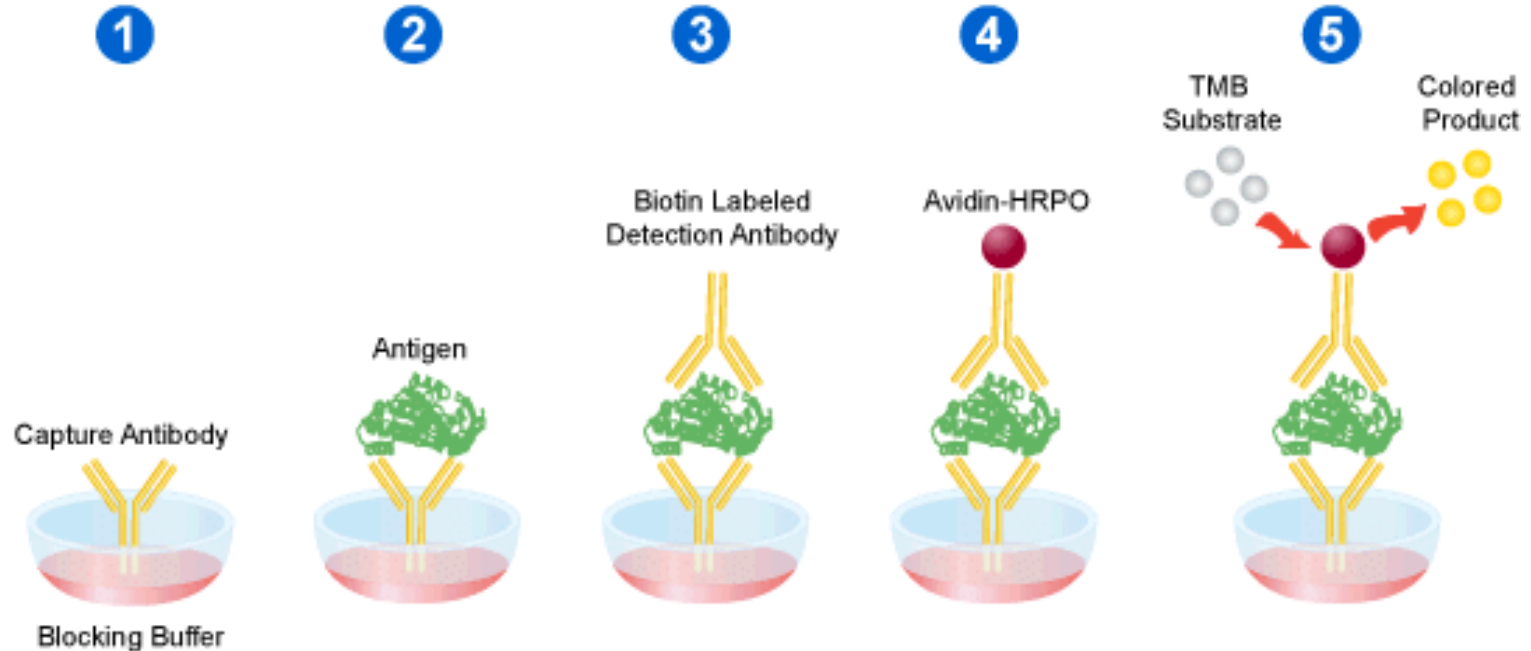
1. Serologische detectie

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

2. Detectie op basis van genetisch materiaal

- RT-PCR
- Real-time PCR
- HTS

Sandwich ELISA



PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie

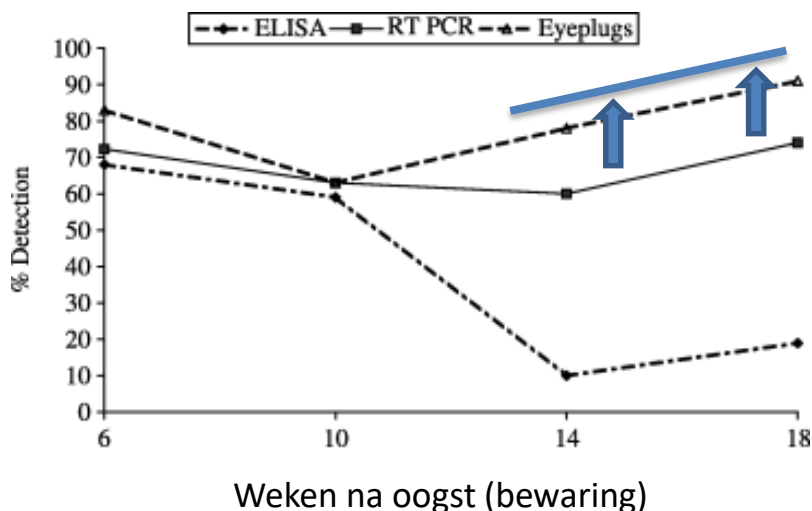
ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

2. Detectie op basis van genetisch materiaal

- RT-PCR
- Real-time PCR
- HTS

Op aardappel: ELISA test steeds op blad na opkweek in de serre

2018 A. Fox, pers. communicatie



Figuur: © Adrian Fox, fera UK (2005)

- Directe ELISA op knollen – *onderschatting*
- Door opkweek in de serre – *aanrijking van de virusconcentraties*
- Directe PCR op knollen

PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. **Serologische detectie** ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Foto: grow-out procedure en ELISA op blad © SASA

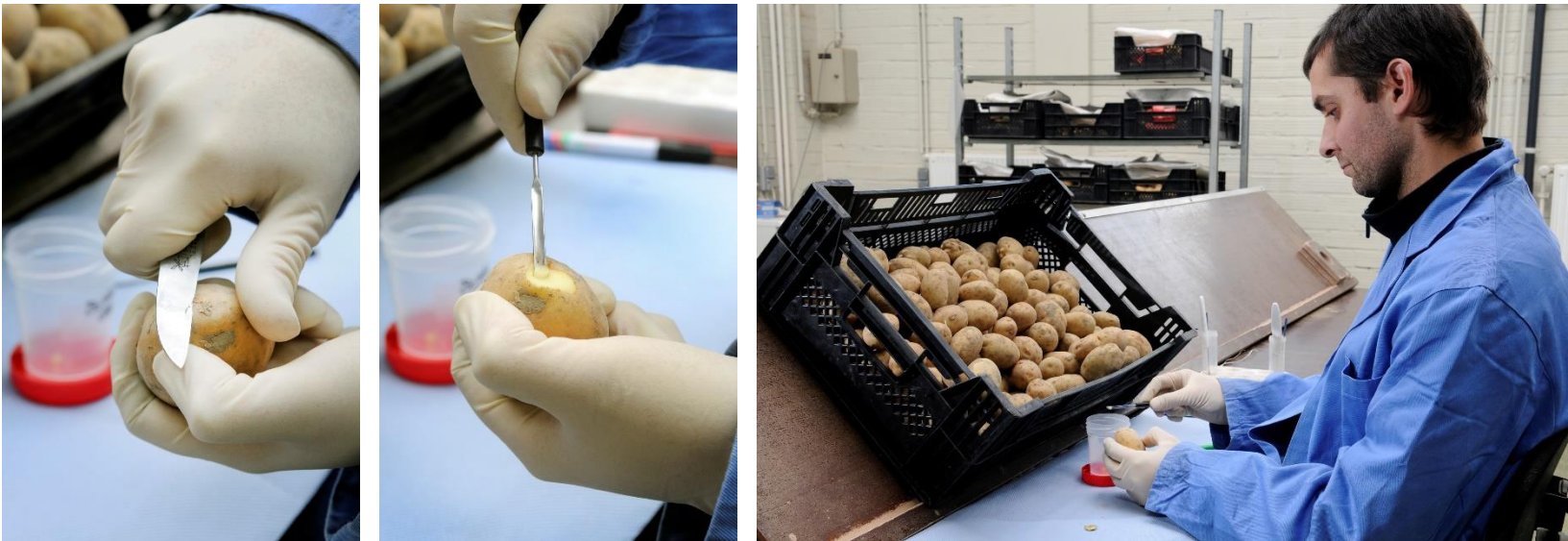


PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. **Detectie op basis van genetisch materiaal**
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Op aardappel: zowel mogelijk op blad na opkweek als direct op knol



1. Pitten van navel + topoog

PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Op aardappel: zowel mogelijk op blad na opkweek als direct op knol

Procedure:

1. Pitten navel + topoog
2. Poolen per 10
3. Tien testen per monster (100 knollen)
4. Score op 10 – omzetten naar %
seedcalc8 (ISTA)

Screenshot seedcalc voor 3 positieve testen op 10 pools : berekend virus % = 3,5 % en betrouwbaarheidsinterval 95 % = 0,69-10,03

# of Seed Pools	10	Computed % in sample	3,50 %
# of Seeds per Pool	10		
Total Seeds Tested	100	<i>Measured property on seed pools</i>	
# Deviants Pools	3	Desired Confidence Level	95 %
Upper Bound of True % Impurity		8,91	
		(95% confident that the lot impurity is below 8,91%.)	
2-sided CI for True % Impurity		0,69 to 10,03	
Lower Bound of True % Purity		91,09	
		(95% confident that the lot purity is above 91,09%.)	
2-sided CI for True % Purity		89,97 to 99,31	

Voorwaarde: random staalname – positieven homogeen verdeeld

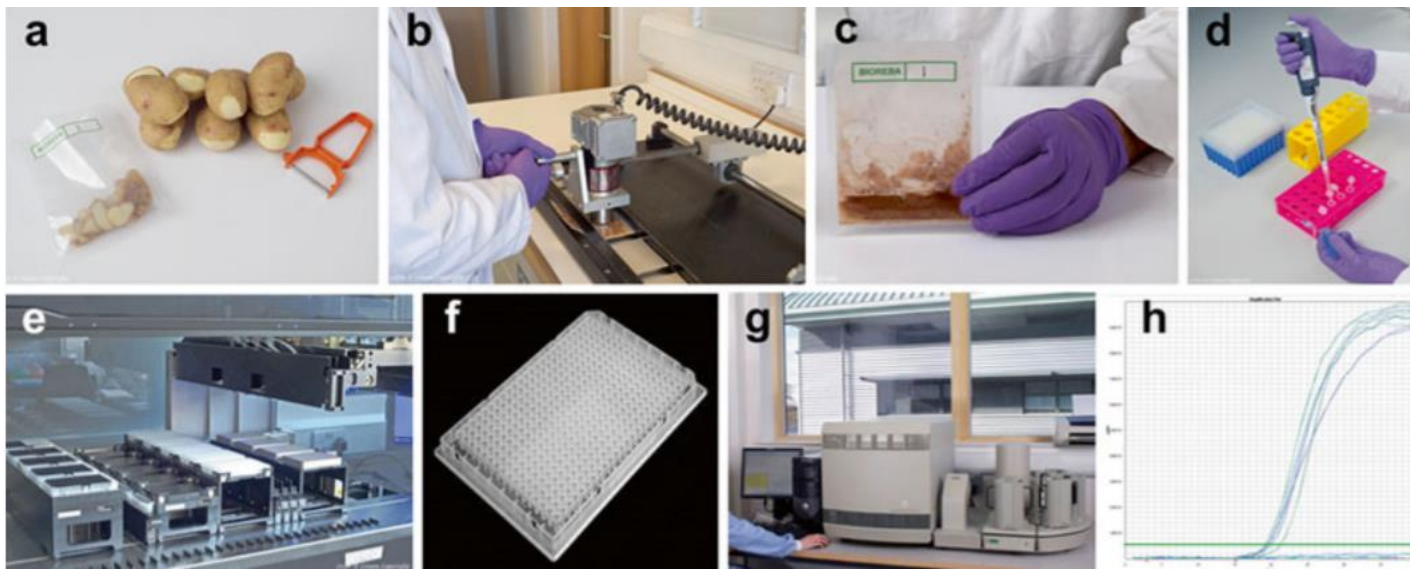
PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Op aardappel: zowel mogelijk op blad na opkweek als direct op knol

Foto: PCR procedure op knollen © SASA



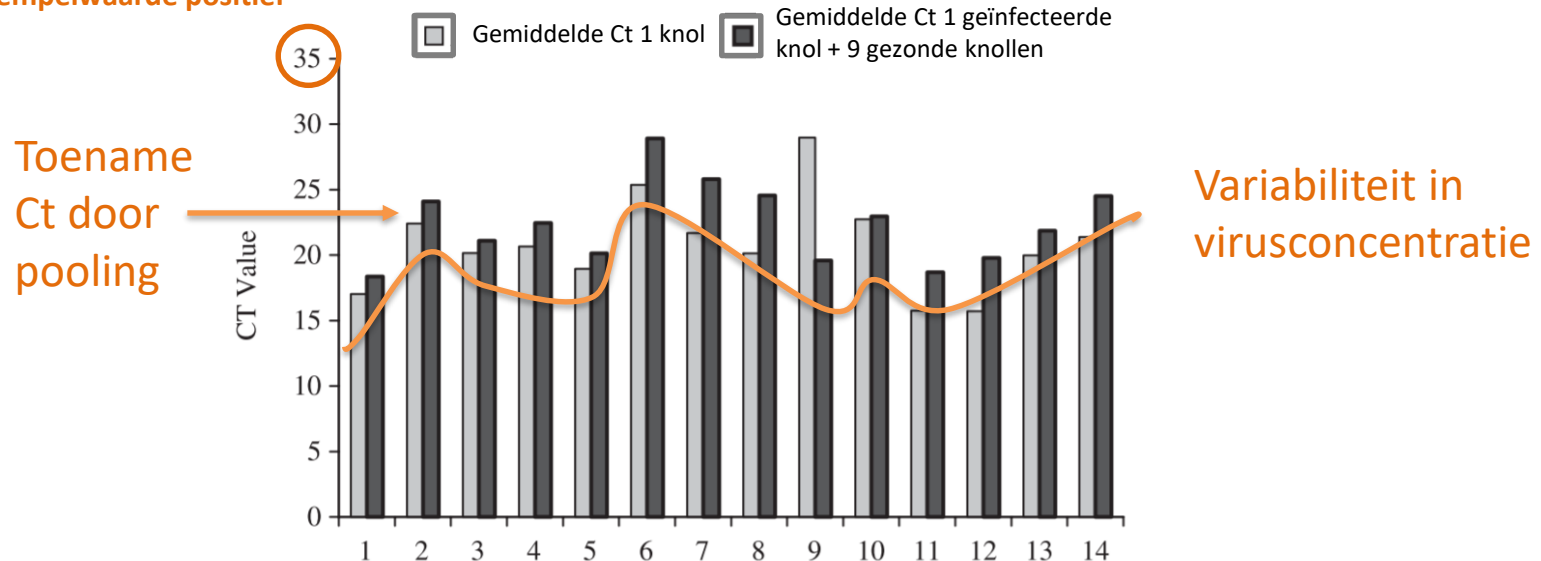
PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

Invloed van de poolgrootte op het PCR resultaat

Drempelwaarde positief



PVY – virusdetectie

Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

High-throughput sequencing – de toekomst !

Voordelen van de technologie ?

- Niet gerichte testen: spoort tegelijkertijd Y, X, A, M, S, bladrol op
- Detecteert ook alle andere virussen (gekend en ongekend (ook Q !))
- Volledig genoom gekend => maakt direct ook onderscheid tussen de stammen (dus ook extra info mogelijk over biologische eigenschappen)
- Minstens even gevoelig als PCR
- Enorme tijdswinst mogelijk



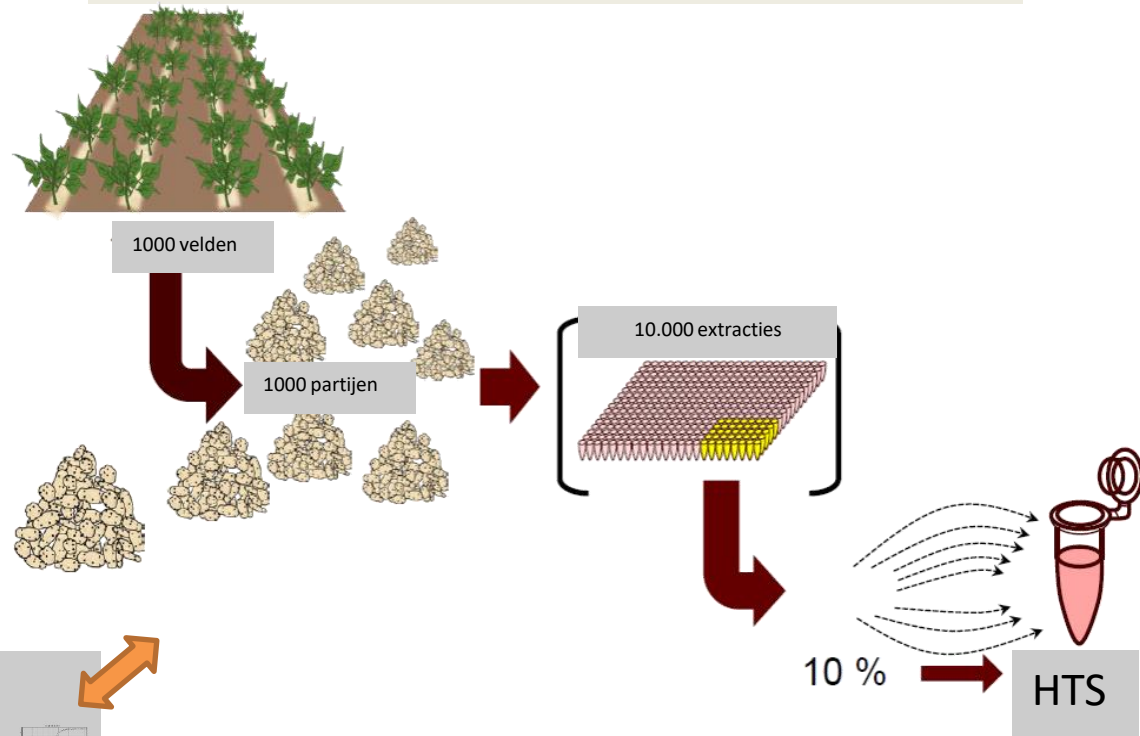
- ✓ Ideaal voor screening van uitgangsmateriaal
- ✓ breed spectrum testen (bijv. voor import/export)
- ✓ ongekende moeilijke problemen

PVY – virusdetectie

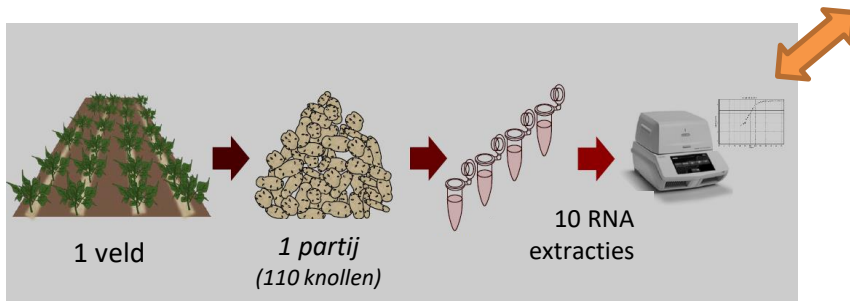
Welke test ?

1. Serologische detectie
2. Detectie op basis van genetisch materiaal
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - HTS

High-throughput sequencing – de toekomst !



PCR



Bedankt !

Instituut voor Landbouw-
en Visserijonderzoek
Burg. Van Gansberghelaan 96
9820 Merelbeke – België
T + 32 (0)9 272 24 00
F +32 (0)9 272 24 29

kris.dejonghe@ilvo.vlaanderen.be
www.ilvo.vlaanderen.be



Vlaanderen
is landbouw & visserij

ILVO
Instituut voor Landbouw-
en Visserijonderzoek