



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Virukset suomalaisessa perunantuotannossa (PERVIRLÄHDE)

Johanna Santala

Laboratorio- ja tutkimuslinja/ Kasvianalytiikka

Perunatutkimuksen talvipäivät

14.4.2021



Tausta

- Suomalaisesta kantasiemenestä tuotetut esiperussiemenerät tutkitaan 6 viruksen osalta vain ensimmäisen avomaatuotanto vuoden jälkeen
 - Ei tiedetä, esiintyykö esim. S-virusta myöhemmissä sukupolvissa
- Ulkomaisesta kantasiemenestä polveutuvat siemenviljelykset tutkitaan 6 siemenen osalta, kun ne ovat ensimmäistä kertaa avomaatuotannossa Suomessa, vaikka erä olisi aiemmin todettu puhtaaksi lähtömaassa
 - Onko tämä 'ylimääräinen' testaus perusteltua?

Taulukko 1. Perunan S-virus -löydökset Ruokaviraston (ennen vuotta 2019 Elintarviketurvallisuusvirasto Evira) virallisissa tarkastuksissa.

Vuosi	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Tutkitut siemenerät (kpl) ^a	52	52	48	44	49	45	65	60	60	97	86	65	37	74	72	72	94
PVS-positiiviset (kpl) ^b	0	0	1	0	0	0	2	3	1	3	1	1	1	4	0	3	3

^aUlkomaisesta kantasiemenestä polveutuvat siemenviljelykset sekä kasvihuoneesta tai aeroponisesta viljelmästä tulevat kotimaiset esiperussiemenet, jotka ovat ensimmäistä kertaa avomaatuotannossa Suomessa.

^bKaikki positiiviset siemenerät ovat ulkomaista alkuperää.

Näytteet



Esiperus- ja perussiemenet

Ruokavirastoon
virustesteihin tulleista:
172 näytettä

Alemmat siemenluokat

Viljelytarkastukset:
64 näytettä

Ruokaperuna

Ruokavirastoon
tulleista rm-näytteistä
94 näytettä

Luonnonkasvit

HG-alueilta ja muilta
perunantuotantoalueilta
241 näytettä 52 eri
kasvilajista



Tutkitaan näytteistä kerralla kaikki tunnetut ja tuntemattomat virukset



Suomalaiseen siemenperunantuotantoon kohdistuva viruspaine ja siemenperunan tarkastuskäytäntöjen mielekkyys. Perunantuotantoon kohdistuva viruspaine ja mahdolliset tulevaisuuden uhat.



Pikku-RNA -sekvensointi

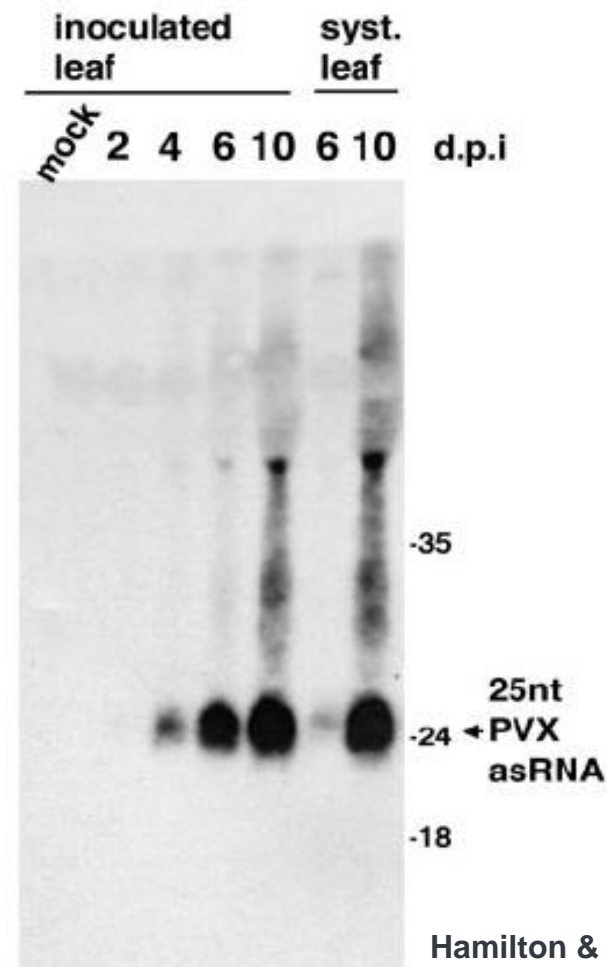
- Kaikki kasvit puolustautuvat viruksia vastaan RNA-hiljennyksen avulla





Pikku-RNA -sekvensointi

- RNA-hiljennyksen seurauksena kasviin kertyy virusperäistä pikku-RNA:ta

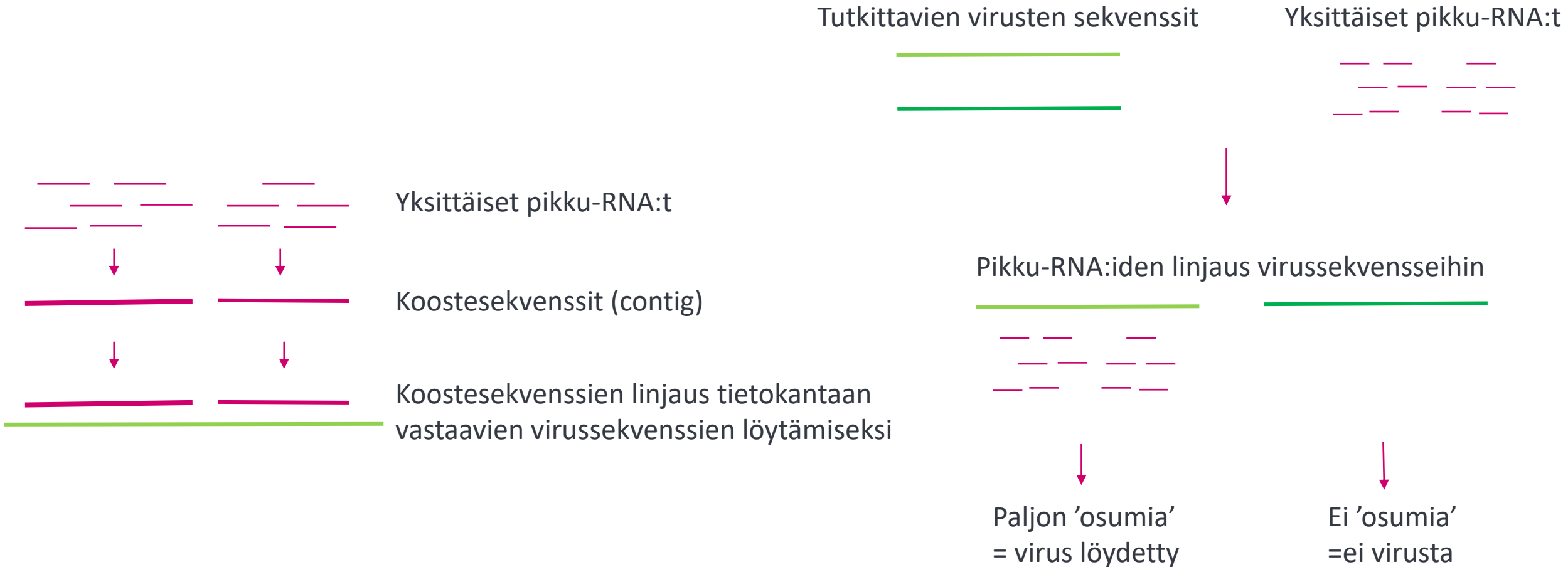


Hamilton & Baulcombe, 1999
Science 286:950-952

Pikku-RNA:n analysointi paljastaa näytteen virukset



Kreuze et al. (2009) Virology 388, 1-7.





Menetelmän käyttöönotto

- Kokeiluiden kautta syväsekvensointiin liittyvä kirjaston valmistus on paranneltu kasvintuhoojalaboratorion käyttöön
 - Kirjaston valmistus kaupallisella tuotteella, muunnosten kera
 - Pienten RNA-molekyylien liittäminen kirjastoon tehostettu muunnelluilla ligaatioolosuhteilla
 - Kirjastoon käytettävät reagenssit puolitettu, jolloin saadaan kustannuksia pienemmiksi
- Sekvensointiajo MiSeq –laitteella vakioitu
 - 18 näytettä/ajo, jolloin teoriassa saadaan 1,3 miljoonaa sekvenssiä/näyte
 - Käytännössä sekvenssien määrä/näyte vaihtelee, koska jokaisen näytteen saaminen mukaan täsmälleen samassa pitoisuudessa on hankalaa
 - Vähintään saadaan noin 0,5-0,6 sekvenssiä/näyte

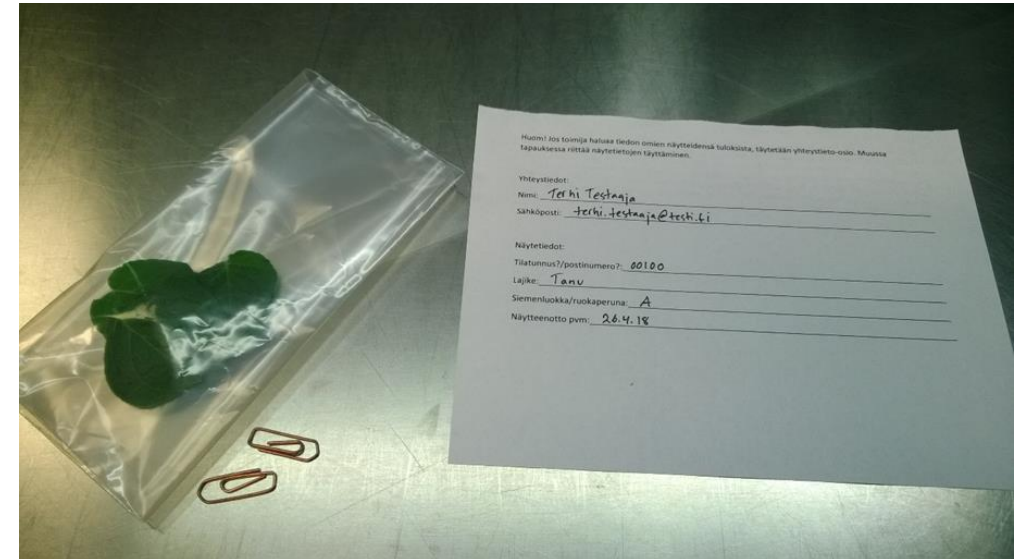
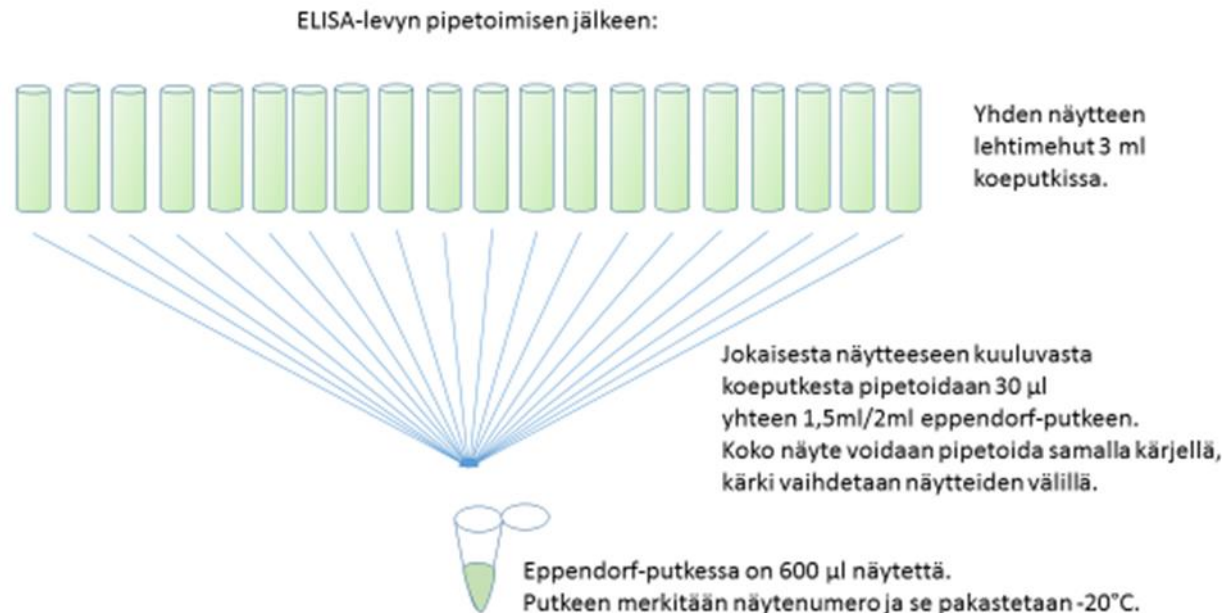
Tuloksia perunanäytteistä





Virukset esiperus- ja perussiemenessä

- Esiperus- ja perussiemennäytteistä (PB, S, SE, E) löytyi vain perunan Y – virusta
 - PVY löytyi pääasiassa samoista näytteistä kuin virallisissa ELISA-testeissä





Ruokaperuna

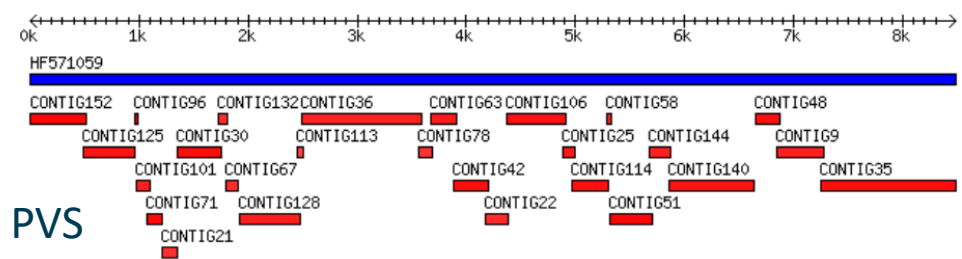
- PVS ja PVM positiiviset näytteet varmistettiin Ruokavirastossa käytössä olevalla reaaliaikaisella PCR-testillä
- PVS löytyi yhteensä kuudesta sadon 2018 ruokaperunanäytteestä
 - Sekvenssin perusteella kaikki löydetyt virukset kuuluivat PVS-O ryhmään
- PVM löytyi yhdestä näytteestä

Satovuosi	Näytteet yhteensä (kpl)	Seedcalc 8 -ohjelmistolla arvioitu virusta sisältävien näytteiden osuus tutkituista näytteistä			
		PVY	PMTV	PVS	PVM
2017	48	11,4 %	25,5 %	0 %	0 %
2018	46	45,1 %	4,9 %	10,7 %	2,4 %

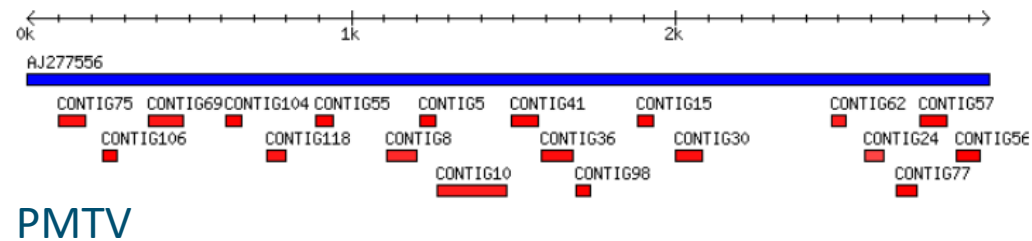


Ruokaperuna

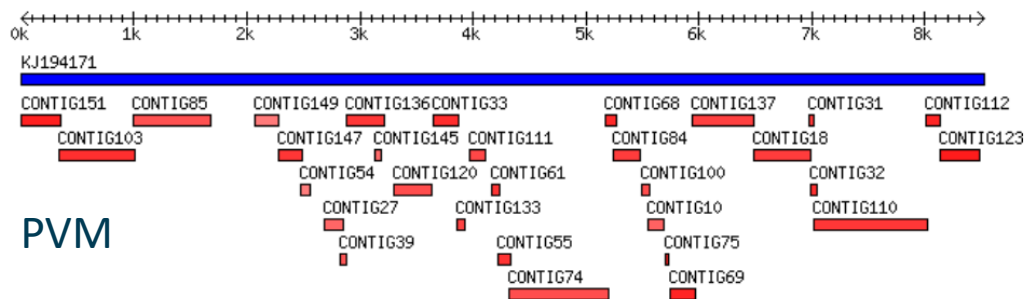
Reference	Length	Coverage (%)	#contig	Depth	Depth (Norm)	% Identity	% Iden Max	% Iden Min	Genus	Description
AJ277556	2964	1423 (48)	19	3.3	7.4	98.74	100	94.64	potyvirus	Potato mop-top virus complete genomic RNA2 for tgbp1 gene, tgbp2 gene, tgbp3 gene and 8K protein gene.
KJ634023	9720	9585 (98.6)	15	19.4	43.8	97.92	100	96.15	potyvirus	Potato virus Y isolate GF_YL20, complete genome.



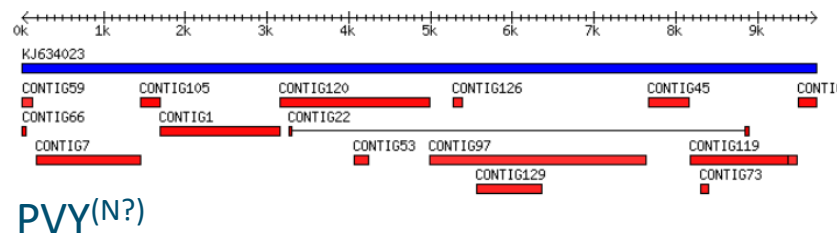
PVS



PMTV



PVM



PVY(N?)



Toimintasuositus

- Uusien virusisolaattien leviämistä Suomen siemenperunatuotantoon tulee ehkäistä. Nykyisillä tarkastuskäytännöillä on saatu pidettyä virustilanne hyvänä, joten nykyisiä tarkastuskäytäntöjä on syytä jatkaa.
- Mahdollinen lainsäädännön muutos koskisi kaikkia kuutta lainsäädännössä mainittua virusta, joten jos muutoksesta haluttaisiin keskustella, on selvitettävä myös muihin viruksiin, kuten PLRV ja PVX, liittyvät riskit. Lisäksi keskustelussa tulee huomioida hankkeen tulokset ja kiinnittää erityistä huomiota mahdollisuuksiin estää haitallisimpien uusien isolaattien, kuten PVS-A -ryhmään kuuluvien virusten, leviämistä.



RUOKAVIRASTO

Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

KIITOS



Tuloksia luonnonkasveista

- Näytteitä kerättiin 241 kpl 52 eri kasvilajista, pääasiassa Compositae- (161 näytettä), Leguminosae- (47 näytettä) ja Chenopodiaceae-heimoista (17 näytettä), Solanaceae- ja Amaranthaceae-heimoista ei saatu näytteitä
- Sekvensoiduksi näistä saatiin 104 kpl
 - RNA-eristys osoittautui joillakin lajeilla niin hankalaksi, ettei se onnistunut projektin puitteissa
 - Sekvensointi onnistui teknisesti hyvin (1,3 milj readiä/näyte, joista 27 % kooltaan 18-25 nt)
 - 18 näytteestä löytyi viruksia (kts. Seuraava sivu)
- Valkoapilalta löydetyistä viruksista valmistumassa pro gradu -työ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O		
1	Sample	Species	Family	Reference	Length	Coverage (%)	#contig	Depth	Depth (Norm)	%Identity	%Iden Max	%Iden Min	Genus	Description	Method		
2	22	Trifolium repens	Fabaceae	JX971976	2435	1838 (75.5)	13	6	9,9	98,14	100	95,15	betapartitivirus	White clover cryptic virus 2 isolate IPP_Lirepa segment RNA 1, complete sequence.	blastn		
3				MH427307	2240	1166 (52.1)	15	4,1	6,6	98,11	100	94	betapartitivirus	White clover cryptic virus 2 isolate WCCV2-RNA2-TAS coat protein gene, complete cds.	blastn		
4	23	Chenopodium album	Chenopodiaceae	HMS60703	1575	753 (47.8)	5	19,6	54	83,2	87,34	81,17	deltapartitivirus	Beet cryptic virus 2 segment dsRNA1, complete sequence.	blastn		
5				ARJ58792.1	411	264 (64.2)	5	16,8	46,3	54,47	68,25	43,69	NA	Carnation cryptic virus 3 segment RNA2, complete sequence.	blastx		
6				ADP24758.1	393	140 (35.6)	3	16,8	46,1	64,29	65	62,07	deltapartitivirus	Beet cryptic virus 2 segment dsRNA2b, complete sequence.	blastx		
7				ABY53441.1	254	90 (35.4)	2	80	165,8	50,53	54,76	47,17	NA	Ambrosia asymptomatic virus 1 UKM-2007 isolate 05TGP00321.Flex4 replicase gene, p	blastx		
8				ABY53444.1	248	67 (27)	2	81,8	169,5	69,12	72,22	65,62	NA	Ambrosia asymptomatic virus 1 UKM-2007 isolate 05TGP00321.Flex5 coat protein gene	blastx		
9				AHB87033.1	1592	339 (21.3)	8	89,2	184,9	65	91,18	44,9	NA	Ambrosia asymptomatic virus 1 isolate 05TGP00321 putative RNA-dependent RNA po	blastx		
10				ABX55878.1	187	61 (32.6)	1	143,7	297,6	39,34	39,34	39,34	foveavirus	Rupestris stem pitting associated virus isolate RS11 RNA-dependent RNA polymerase	blastx		
11				AAB32330.1	1646	98 (6)	3	106	219,6	69,7	91,43	55,88	potexvirus	putative polymerase...capsid protein [potato aucuba mosaic potexvirus PAMV, Genol	blastx		
12				ASJ78784.1	1437	97 (6.8)	3	82,2	170,4	64,29	76,67	55,88	potexvirus	Vanilla virus X isolate CRV2148POT, complete genome.	blastx		
13	35	Epilobium angustifolium	Onagraceae	AAA03489.1	1456	89 (6.1)	3	114,4	237	73,33	88,57	55,88	potexvirus	Potato virus X mRNA, complete cds.	blastx		
14				AFJ00093.1	1542	81 (5.3)	3	50	103,6	67,9	81,82	56,67	potexvirus	Cactus virus X isolate NTU, complete genome.	blastx		
15				AAA03491.1	115	27 (23.5)	1	88,8	184	59,26	59,26	59,26	potexvirus	Potato virus X mRNA, complete cds.	blastx		
16				ATX64301.1	1387	212 (15.3)	5	96,3	199,6	66,51	84,21	55,56	potexvirus	UNVERIFIED: Hydrangea ringspot virus isolate T1 RNA-dependent RNA polymerase, c	blastx		
17				AIB00369.1	1386	147 (10.6)	5	75,9	157,3	70,07	79,17	63,33	potexvirus	Yam virus X isolate T551, complete genome.	blastx		
18				BAE06191.1	1417	130 (9.2)	4	96,5	200	65,38	88,24	46,34	potexvirus	Cymbidium mosaic virus genomic RNA, complete genome.	blastx		
19				CAC87086.1	1631	128 (7.8)	3	100	207,2	60,94	75,47	45,83	potexvirus	Scallion virus X, complete genome.	blastx		
20				ALQ43526.1	1591	125 (7.9)	3	111,2	230,3	65,6	79,17	47,92	potexvirus	Actinidia virus X strain RV-3124 RNA-dependent RNA polymerase, triple gene block p	blastx		
21	48	Trifolium pratense	Fabaceae	MG253828	7326	821 (11.2)	14	2,5	32,3	97,93	100	95,35	nepovirus	Red clover nepovirus A isolate B46 segment RNA1, complete sequence.	blastn		
22				MG253829	4682	766 (16.4)	13	3,4	45,1	95,95	100	90,48	nepovirus	Red clover nepovirus A isolate B46 segment RNA2, complete sequence.	blastn		
23	51	Raphanus sativus var. oleiformis	Brassicaceae	DQ181927	1778	951 (53.5)	13	2,2	8,2	99,16	100	95,74	NA	Raphanus sativus cryptic virus 1 segment dsRNA 6, complete sequence.	blastn		
24				DQ181926	1791	598 (33.4)	11	2,2	8,1	99,5	100	97,89	NA	Raphanus sativus cryptic virus 1 segment dsRNA 2, complete sequence.	blastn		
25				AY748911	1866	1262 (67.6)	13	2,9	10,8	98,73	100	96,79	NA	Radish partitivirus JC-2004 RNA-dependent RNA polymerase gene, complete cds.	blastn		
26	67	Trifolium repens	Fabaceae	EF466131	603	603 (100)	1	13,6	34,8	99,17	99,17	99,17	luteovirus	Soybean dwarf virus isolate BBA-1 coat protein gene, complete cds.	blastn		
27				JN674402	5862	3830 (65.3)	39	16,1	41,3	94,41	100	86,81	100	86,81	luteovirus	Soybean dwarf virus MD6-Y, complete genome.	blastn
28				AB038147	5853	3040 (51.9)	36	14,7	37,5	94,28	100	82,72	100	82,72	luteovirus	Soybean dwarf virus genomic RNA, complete genome, strain:YS.	blastn
29	79	Chenopodium album	Chenopodiaceae	A EJ07892.1	478	391 (81.8)	3	29,1	87,9	60,56	71,43	59,2	deltapartitivirus	Pepper cryptic virus 2 isolate HW-01 segment RNA1, complete sequence.	blastx		
30	118	Raphanus sativus var. oleiformis	Brassicaceae	AY949985	1866	990 (53.1)	10	2,9	16,4	99,39	100	97,78	NA	Raphanus sativus cryptic virus 1 segment dsRNA 1, complete sequence.	blastn		
31				MF686921	1986	650 (32.7)	13	2	11	99,54	100	97,62	NA	Raphanus sativus cryptic virus 4 isolate FH1147 putative RNA-dependant RNA polyme	blastn		
32				DQ181927	1778	415 (23.3)	5	1,8	9,9	99,76	100	98,55	NA	Raphanus sativus cryptic virus 1 segment dsRNA 6, complete sequence.	blastn		
33				DQ181926	1791	206 (11.5)	3	1,8	9,8	98,54	100	97,8	NA	Raphanus sativus cryptic virus 1 segment dsRNA 2, complete sequence.	blastn		
34				MF686922	1761	135 (7.7)	3	1,5	8,5	99,26	100	97,78	NA	Raphanus sativus cryptic virus 4 isolate FH1147 coat protein gene, complete cds.	blastn		
35	125	Trifolium repens	Fabaceae	JX971976	2435	969 (39.8)	14	2,4	5,6	99,38	100	95,45	betapartitivirus	White clover cryptic virus 2 isolate IPP_Lirepa segment RNA 1, complete sequence.	blastn		
36				EF466131	603	593 (98.3)	1	5,1	11,7	98,82	98,82	98,82	luteovirus	Soybean dwarf virus isolate BBA-1 coat protein gene, complete cds.	blastn		
37				JN674402	5862	2201 (37.5)	32	5,3	12,3	96,86	100	93,18	100	93,18	luteovirus	Soybean dwarf virus MD6-Y, complete genome.	blastn
38				AB038148	5841	1473 (25.2)	25	4,5	10,4	97,33	100	93,62	100	93,62	luteovirus	Soybean dwarf virus genomic RNA, complete genome, strain:YP.	blastn
39				ADV40940.1	598	251 (42)	4	42,1	97,5	55,12	64,79	39,34	NA	Carnation yellow fleck virus, complete genome.	blastx		
40				ADV40942.1	216	132 (61.1)	2	40,1	92,6	41,79	53,12	38,24	NA	Carnation yellow fleck virus, complete genome.	blastx		
41				ADV40943.1	202	130 (64.4)	1	49,6	114,6	33,85	33,85	33,85	NA	Carnation yellow fleck virus, complete genome.	blastx		
42				ADV40944.1	599	389 (64.9)	4	41,3	95,4	58,82	70	51,72	electrovirus	Cranberry leafroll associated virus 2, complete genome.	blastx		