

Onderzoek naar details van bodemgebonden verspreiding van TVX bij tulp

Maarten de Kock, Miriam Lemmers, Khanh Pham & Suzanne Lommen,

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361485 00/ PT nr. 14590
December 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Projectnummer: 32 361485 00

PT Projectnummer: 14590

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Postbus 85, 2161 AB Lisse
: Professor van Slogterenweg 2, 2161DW Lisse
Tel. : +31 0252 462148
Fax : +31 0252 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INTRODUCTIE EN DOELSTELLING	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Achtergrondinformatie.....	7
1.3 Doelstelling	8
2 WERKWIJZE.....	9
2.1 Pottenproef met tulp en <i>Chenopodium amaranticolor</i>	9
2.2 Onderzoek in een vollegrondskas.....	10
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
3.1 Pottenproef met tulp	13
3.2 Pottenproef met <i>Chenopodium amaranticolor</i>	14
3.3 Onderzoek in vollegrondskas	15
3.4 Algemene discussie	16
4 CONCLUSIES	19
5 PRAKTIJKMAATREGELEN.....	21
5.1 Voorkom een besmetting met TVX vanuit de grond.....	21
5.2 Voorkom de aanleg van virusreservoirs met TVX	21
6 GERAADPLEEGDE DOCUMENTEN	23

Samenvatting

De afgelopen jaren heeft onderzoek aan Tulpenvirus X (TVX) uitgewezen dat dit virus tijdens de bewaring van tulpenbollen door tulpengalmijt wordt verspreid. Tevens is bekend dat er tijdens het koppen en ontbollen een risico op verspreiding van dit virus is. Daarentegen is het risico op mechanische verspreiding tijdens mechanisch pellen, spoelen en waterbroei gering. Tijdens dit onderzoek zijn diverse aanwijzingen verkregen voor verspreiding van TVX via de grond. Praktijkmaatregelen zijn pas te formuleren wanneer deze verspreidingsroute experimenteel bevestigd is en de bijbehorende vector of verspreidingsroute bekend is.

Via diverse onderzoeksstrategieën is onderzocht wat de risico's op bodemgebonden infectie met TVX bij tulp is. Hierbij is o.a. gebruik gemaakt van grond uit een vollegrondskas waar in 2011 bodemgebonden verspreiding van TVX is waargenomen. Teeltproeven met tulp, maar ook met diverse vanggewassen zijn uitgevoerd en de aanwezigheid van bodemschimmels die als virusvector kunnen optreden is bepaald.

In een pottenproef met aanwezigheid van TVX-besmette tulpen vond er bij virusvrije tulp zeer beperkt virusverspreiding via de bodem plaats. Daarentegen vond er in een vergelijkbare pottenproef met TVX-besmette grond bij de vangplant *Chenopodium amaranticolor* veel efficiënter infectie met TVX vanuit de bodem plaats.

Tijdens de teelt in de vollegrondskas met grond met TVX-geschiedenis vond er bij tulp geen virusinfectie vanuit de bodem plaats. Daarentegen werd op deze grond wel infectie bij *Chenopodium* vangplanten, brandnetel en vogelmuur waargenomen. Er was dus weldegelijk een virusreservoir in de bodem aanwezig. Er is zeer waarschijnlijk geen bodemorganisme betrokken bij infectie met TVX vanuit de bodem.

Bij infectie vanuit de bodem is bij *Chenopodium* en onkruiden TVX het eenvoudigst aan te tonen in een wortelmonster. TVX verspreidt niet snel systemisch door de plant waardoor bladbemonstering ongeschikt is voor het aantonen van recente besmettingen vanuit de grond. Op basis van deze resultaten wordt voor onderzoek naar virusreservoirs bij onkruiden geadviseerd zich met name te concentreren op het ondergrondse deel van de plant.

De resultaten beschreven in dit rapport laten zien dat bodemgebonden infectie met TVX complexer is dan vooraf gedacht. Specifieke bodemomstandigheden kunnen een cruciale rol spelen bij het wel of niet optreden van infectie vanuit de bodem bij tulp. Deze bodemomstandigheden zijn bij tulp blijkbaar kritischer dan bij vangplanten. Een lijst met maatregelen is samengesteld waarmee TVX-verspreiding via de bodem ze veel als mogelijk beperkt kan worden.

1 Introductie en doelstelling

1.1 Aanleiding

De afgelopen jaren heeft onderzoek aan Tulpenvirus X (TVX) uitgewezen dat dit virus tijdens de bewaring van tulpenbollen door tulpengalmijt wordt verspreid. Tevens is bekend dat er tijdens het kappen en ontbollen een risico op verspreiding van dit virus is. Recent onderzoek heeft uitgewezen dat er nog enkele andere routes voor infectie en verspreiding van TVX zijn (De Kock e.a., 2008, 2009; 2010, 2012):

1. Mechanische verspreiding tijdens mechanisch pellen, spoelen en waterbroei. De mate van virus op virusoverdracht is gering tot zeer gering (maximaal enkele procenten toename van TVX).
2. Drie verschillende resultaten gaven aanwijzingen voor verspreiding via de grond:
 - a) Virusvrije tulpen raakten met TVX geïnfecteerd wanneer ze geteeld werden op grond waar bladresten van TVX-geïnfecteerde planten doorheen gefreesd waren. In het eerste onderzoeksjaar was deze infectie aanzienlijk (12.5% TVX), in het tweede onderzoeksjaar werd infectie vanuit de grond nauwelijks waargenomen (0.3% TVX). Specifieke teeltomstandigheden waren waarschijnlijk verantwoordelijk voor dit verschil.
 - b) Tijdens de teelt van virusvrije- en TVX-tulpen in een vollegrondskas zijn sterke aanwijzingen verkregen voor TVX-verspreiding tijdens de teelt. Bij twee verschillende experimenten bleken virusvrij geplante tulpen tijdens de bladtoets TVX te bevatten. De virusvrij geplante tulpen groeiden naast tulpen die besmet waren met TVX. Op geen enkele wijze heeft mechanische verspreiding kunnen plaatsvinden. De verspreiding via de bodem, mogelijk via een bodemgebonden vector is daarom aannemelijk. Tijdens de teelt werden *Olpidium* schimmels met microscopie en PCR-diagnostiek waargenomen op wortels van de tulpen. TVX-verspreiding via mijten tijdens de teelt is niet aangetoond.
 - c) Na het rooien van deze twee proeven heeft op verzoek spontane onkruidgroei plaats gevonden. In de spontaan opgekomen brandnetel is in het blad met PCR-diagnostiek TVX aangetoond. Dit resultaat suggereert dat na de teelt van viruszieke tulpen een virusreservoir in de grond aanwezig blijft dat bij een volgend vatbaar gewas tot infecties met TVX kan leiden.

1.2 Achtergrondinformatie

In bovenstaande alinea staan diverse resultaten beschreven die aanleiding zijn voor dit onderzoeksvoorstel. De beschreven resultaten suggereren het volgende:

- Vanuit TVX-geïnfecteerde tulpen of virusgeïnfecteerd bladmateriaal is een vector besmet geraakt met TVX. Tijdens de teelt heeft de TVX-geïnfecteerde vector tulpen kunnen infecteren met TVX. Tevens is de TVX-geïnfecteerde vector na de oogst van de bollen in virulente toestand in de grond aanwezig gebleven. Aansluitend op de oogst heeft deze TVX-geïnfecteerde vector brandnetel kunnen infecteren met TVX. Of de vector een biologische oorsprong heeft, is nog onduidelijk.
- Brandnetel is een (nieuwe) waardplant voor TVX. Melganzevoet was in 2010 al als waardplant voor TVX geïdentificeerd.

Als gevolg van (a) een bredere waardplantenreeks voor TVX dan alleen tulp, en (b) een biologische verspreidingsroute te velde, kan er te velde bij slecht onkruidbeheer een TVX-reservoir opgebouwd worden dat tijdens de teelt, maar ook in een aansluitende teelt tot nieuwe virusinfecties kan leiden. Deze hypothese kan mogelijk een aantal onverklaarbare incidenten met TVX-infecties in de praktijk verklaren. Deze verspreidingsroute, inclusief het ontstaan van een virusreservoir voor TVX buiten tulp, is kennis uit de zomer van 2011.

Er zijn een beperkt aantal biologische vectoren voor potexvirussen beschreven. Tulpengalmijt was al langer bekend als overdrager van TVX in de bewaring.

Recent onderzoek heeft aangetoond dat stromijt en bollenmijt onder geconditioneerde omstandigheden ook in staat zijn TVX van bol tot bol te kunnen verspreiden. Een grote betrokkenheid van bollen- en stromijt als vector tijdens de bewaring van bollen is echter niet groot. Er zijn geen aanwijzingen dat mijten betrokken zijn bij TVX-verspreiding *tijdens* de teelt.

In 2010 is bij vollegrondse geteelde tomaat verspreiding van *Pepino mosaic virus* (PepMV) door de bodemschimmel *Olpidium virulentus* beschreven (Alfaro-Fernández, et al). PepMV is net als TVX en PIAMV ook een potexvirus. Overig bodemschimmels waarvan bekend is dat deze betrokken kunnen zijn bij overdracht van plantenvirussen zijn *Olpidium brassicae*, *Polymyxa graminis* en *Spongospora subterranea*. Een betrokkenheid bij overdracht van potexvirussen is voor deze drie bodemschimmels niet bekend.

PPO-onderzoek naar verspreidingsroutes voor *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV) heeft aangetoond dat PIAMV via de bodem van plant naar plant kan verspreiden. Ook kunnen virusreservoirs in de bodem achterblijven die in een nieuwe teelt voor infectie kunnen zorgen. Bij deze verspreidingsroute is echter zeer waarschijnlijk geen biologische vector betrokken (De Kock e.a. 2013a,b).

Verspreiding van potexvirussen zoals TVX via nematoden is nooit eerder gerapporteerd. Daarnaast hebben experimenten uit PT-project 13630 geen aanwijzingen opgeleverd die suggereren dat virusvectoren als (para-) trichodoride- of *Xiphinema*-nematoden een rol spelen bij deze bodemgebonden verspreidingsroute (De Kock, e.a. 2012). TVX-verspreiding via bladluizen is op basis van onderzoeksresultaten niet aannemelijk.

TVX kan via verwonding/beschadiging van planten of bollen verspreiden. Tijdens de teelt kan tijdens het machinaal koppen TVX-verspreiding optreden. De virustoenname blijft, afhankelijk van weersomstandigheden, beperkt tot maximaal enkele procenten. Tijdens mechanisch pellen, spoelen en waterbroei op prikbakken kan er bij een TVX-geïnfecteerde partij ook geringe verspreiding van TVX plaatsvinden. De virusverspreiding is relatief laag en blijft bij aanwezigheid van een infectiebron beperkt tot maximaal enkele procenten.

De mate waarin TVX-verspreiding in de praktijk optreedt, is een optelsom kleine risico's als gevolg van mechanische beschadiging tijdens teelt en verwerking. Virusverspreiding door tulpengalmijten tijdens de bewaring of door de onbekende bodemgebonden vector lijkt veel effectiever te zijn dan de mechanische verspreiding tijdens de teelt en verwerking.

Er zijn enkele incidenten van TVX infecties bij lelie bekend. Infectie met TVX *tijdens de lieweteelt* (en dus waarschijnlijk via een biologische vector) was op basis van gesprekken met partij-eigenaren niet uit te sluiten.

Onderzoekers van onderzoeksinstituut Bioforsk te Noorwegen hebben uit grond van een oude boomgaard met vangplanten (*Nicotiana tabacum*) een virus geïsoleerd dat bij nadere analyse TVX bleek te zijn. Op deze grond heeft nooit teelt van tulp plaats gevonden. Het geïsoleerde virus is redelijk vergelijkbaar met aan het TVX-virus dat in Nederland in tulp voorkomt. Deze stam van TVX is echter niet eerder aangetoond bij tulp. Deze resultaten bevestigen de vermoedens dat (a) TVX mogelijk een bredere waardplantenreeks heeft dan alleen tulp en (b) TVX via de grond is overgebracht naar de vangplanten.

1.3 Doelstelling

Er zijn diverse concrete aanwijzingen voor verspreiding van TVX via een bodemgebonden vector. Praktijkmaatregelen zijn pas te formuleren wanneer deze verspreidingsroute experimenteel bevestigd is en de bijbehorende vector of verspreidingsroute bekend is.

2 Werkwijze

2.1 Pottenproef met tulp en *Chenopodium amaranticolor*

Grond uit een vollegrondskas waar in 2011 bodemgebonden verspreiding van TVX is waargenomen, is gebruikt voor dit vervolgonderzoek in 2012. In het eerdere onderzoek waarvan de teelt in 2011 plaatsvond (De Kock e.a. 2013) werd in alle controlebehandelingen zonder TVX-bron onverwachts een infectie van TVX aangetroffen in de gezonde partij. Ook was het percentage TVX in de viruszieke partij sterk toegenomen terwijl een ander deel van de partij dat in andere proeven is gebruikt, geen virustoenname liet zien maar op gelijk viruspercentage was blijven steken. De combinatie van alle resultaten leidde tot het vermoeden dat virusoverdracht (ook) na de bewaring in de kas plaats had gevonden. Deze grond uit deze kas wordt in dit rapport 'verdachte grond' genoemd. Meer details over deze grond en de teeltproeven zijn beschreven in De Kock e.a. (2013).

Teelt van virusvrije tulpen en de vangplant *Chenopodium amaranticolor* werd uitgevoerd met deze verdachte grond. De benodigde grond voor de pottenproeven is afgegraven uit desbetreffende vollegrondskas. In de verdachte grond uit de vollegrondskas waren *Longidorus* en *Xiphinema* aaltjes afwezig. Er waren 5 *Paratrichodorus nanus*/250 ml grond aanwezig. Naast teelt op deze verdachte grond en op potgrond (controle) werden twee aanvullende behandelingen toegevoegd:

- Teelt op de verdachte grond behandeld met een fungicide om schimmels waaronder *Ophiostoma* af te doden. Hiertoe is de verdachte grond behandeld met Captan (2g per kg grond). De tulpenbollen die op deze grond zijn geteeld, zijn voorafgaand aan planten gedompeld in Captan.
- Teelt op verdachte grond welke grondig gestoomd is. Bodemleven is dan afwezig.

Bij de teelt van tulpen heeft de pottenteelt plaatsgevonden met en zonder extra aangeplante TVX-bron. Bij aanwezigheid van een TVX-virusbron waren één virusvrije tulp (cv. Judith Leijster) en één getoetst TVX-besmette tulp (cv. La Courtine) aanwezig in één 5 liter pot. Bij afwezigheid van een extra virusbron werd elke virusvrije tulp per stuk op pot geplant (1,5 liter pot) (Figuur 1).

Eventuele infectie met TVX vanuit de bodem is bepaald met een ELISA-toets op het blad. Tevens is eventuele infectie met TVX met een ELISA-toets op de bol bepaald.

Tabel 1. Proefopzet voor onderzoek naar bodemgebonden verspreiding van TVX bij tulp. Tulpen zijn geteeld op potgrond en verdachte grond die al dan niet met een fungicide is behandeld of is gestoomd. Een aanvullende virusbron is aangebracht door in specifieke behandelingen een getoetst TVX-besmette tulp simultaan mee te laten groeien.

behandeling	code	virusbron	Aantal herhalingen	pot (liter)	liter grond/ behandeling	bollen/pot		nummer
						La Courtine	Judith Leyster	
Controle (potgrond)	C1	-	200	0.5	100	0	1	1-200
	C2	+	50	1.5	75	1	1	201-250
Verdachte grond	V1	-	40	0.5	20	0	1	251-290
	V2	+	50	1.5	75	1	1	291-340
Verdachte grond behandeld met fungicide	F1	-	40	0.5	20	0	1	341-380
	F2	+	50	1.5	75	1	1	381-430
Verdachte grond gestoomd	S1	-	40	0.5	20	0	1	431-470
	S2	+	50	1.5	75	1	1	471-520



Figuur 1. Foto van de pottenproef. In de 5-literpotten (oranje) zijn een TVX-zieke tulp en een virusvrije tulp aanwezig. De virusvrije tulp staat bij het etiket. In de 1,5 liter pot (zwart) is slechts één virusvrije tulp aanwezig. De potten staan op individuele plateaus zodat er via uitgelekt gietwater geen contaminatie tussen potten kan plaatsvinden.

Bij de teelt van de vangplant *C. amaranticolor* werden per behandeling tien 1.5 liter potten met stekjes van *C. amaranticolor* geplant. Een extra virusbron werd aangelegd door tijdens de teelt wekelijks TVX-besmet plantensap aan de grond toe te voegen. Eventuele infectie met TVX vanuit de bodem is bepaald met een ELISA-toets op het blad. Daarnaast is eventuele infectie met TVX bepaald met een TaqMAN PCR toets op het blad- en wortelmonsters. Bij de PCR analyse werden drie mengmonsters onderzocht welke waren samengesteld uit 8 plantjes per mengmonster.

2.2 Onderzoek in een vollegrondskas

De vollegrondskas waar in 2011 bodemgebonden verspreiding van TVX heeft plaatsgevonden is opnieuw voor dit project gebruikt. In brandnetelplantjes die spontaan opkwamen na het rooien van de TVX-besmette tulpen kon destijds infectie met TVX worden aangetoond. Dit resultaat suggereerde dat na de teelt van viruszieke tulpen een virusreservoir in de grond aanwezig is gebleven dat bij een volgend vatbaar gewas tot infecties met TVX kan leiden.

In deze kas zijn diverse gewassen geteeld. Deze gewassen zijn als vier herhalingen in vier blokken in de kas geteeld. De locatie van de individuele herhalingen in de kas worden aangegeven met 'links voor', 'links achter', 'rechts voor' en 'rechts achter'.

De volgende gewassen zijn in deze kas in vier herhalingen geteeld:

- tulp, cv. Christmas Dream
- tulp, cv. Judith Leyster
- tulp, cv. Menton
- lelie, cv. Tiber
- *Chenopodium album* (vanggewas)
- *Chenopodium amaranticolor* (vanggewas)
- *Chenopodium quinia* (vanggewas)

De *Chenopodium* planten zijn waardplant voor TVX en kunnen als vangplant ingezet worden. Als aanvullende controles zijn de drie tulpecultivars ook geteeld op potgrond en in de vollegrond op de proeftuin. Eventuele infectie met TVX vanuit de bodem is bepaald met een ELISA-toets op het blad. Voor tulp zijn aanvullend ELISA-toetsen op de bol uitgevoerd.

De vier herhalingen namen niet de gehele kas in beslag. Op de overgebleven plekken werd spontane onkruidgroei toegestaan. Aanwezigheid van TVX in wortels en blad van dit onkruid is bepaald met een TaqMAN-PCR toets voor TVX.

Wortelmonsters van tulp, vogelmuur en brandnetels uit deze vollegrondskas zijn met PCR-diagnostiek bestudeerd op aanwezigheid van *Olipidium*, *Polymyxa* spp. en *Plasmodiophora brassicae*.



Figuur 2. Foto van onderzoek in de vollegrondskas. Tulpen, *Chenopodium* vangplanten en lelie staan als rijtjes naast elkaar geplant. Op de niet beplante grond werd onkruidgroei toegestaan.

3 Resultaten en Discussie

3.1 Pottenproef met tulp

Potgrond en grond uit een vollegrondskas is gebruikt voor onderzoek naar overdracht van TVX via de bodem (zie Tabel 2, behandeling C, resp. V). Het jaar voorafgaand aan dit onderzoek was in deze vollegrondskas een sterk vermoeden ontstaan voor virusverspreiding via de bodem. Aanwezige bodemschimmels in de grond uit de kas en op de bollen zijn in behandeling F met het fungicide Captan afgedood. In behandeling S is al het bodemleven in de grond via stomen afgedood. De bollen die in behandeling S zijn geplant, zijn ook behandeld met het fungicide Captan. Het optreden van infectie met TVX in virusvrije tulpen met en zonder aanvullende virusbron in de pot is bepaald met ELISA op zowel het blad als op de bol (Tabel 2).

Op basis van deze uitgebreide ELISA-analyses is er geconstateerd dat er nagenoeg geen infectie met TVX heeft plaatsgevonden. Bij afwezigheid van een virusbron (behandelingen C1, V1, F1 en S1) zijn alle virusvrij aangeplante tulpen vrij van TVX gebleven. Bij aanwezigheid van een virusbron (C2, V2, F2 en S2) werd met een bladtoets een TVX-geïnfecteerde plant aangetroffen bij de teelt op verdachte grond en bij teelt op gestoomde grond (in beide behandelingen bij slechts 1 van de 50 planten). De aanwezigheid van TVX kon uitsluitend bij de teelt op gestoomde grond met een boltoets worden bevestigd.

Infectie via de bodem kan dus optreden bij aanwezigheid van een virusbron tijdens de teelt. In gestoomde grond is het bodemleven afgedood, toch is er één tulp geïnfecteerd geraakt met TVX. Betrokkenheid van een vector is daarom niet aannemelijk. De frequentie van optreden is echter dermate laag dat dit in de praktijk tijdens de teelt van tulpenbollen nauwelijks betekenis heeft.

Tabel 2. Optreden van infectie met TVX vanuit de bodem bij tulp. Tulpen zijn op geteeld op potgrond en verdachte grond die al dan niet met een fungicide behandeld is of is gestoomd. Een aanvullende virusbron is aangebracht door in specifieke behandelingen een getoetst TVX-besmette tulp simultaan mee te laten groeien. Optreden van infectie is bepaald met een TVX-ELISA toets op een bladmonster tijdens de teelt of met een TVX-ELISA toets op de bol aansluitend op de teelt.

behandeling	code	virusbron	N	nummer	% besmet met TVX	
					ELISA bladtoets	ELISA boltoets
Controle (potgrond)	C1	-	200	1-200	0%	0%
	C2	+	50	201-250	0%	0%
Verdachte grond	V1	-	40	251-290	0%	0%
	V2	+	50	291-340	2%	0%
Verdachte grond behandeld met fungicide	F1	-	40	341-380	0%	0%
	F2	+	50	381-430	0%	0%
Verdachte grond gestoomd	S1	-	40	431-470	0%	0%
	S2	+	50	471-520	2%	2%

3.2 Pottenproef met *Chenopodium amaranticolor*

Potgrond en grond uit een vollegrondskas is gebruikt voor onderzoek naar overdracht van TVX via de bodem (behandeling C, resp. V). Het jaar voorafgaand aan dit onderzoek was in deze vollegrondskas een sterk vermoeden ontstaan voor virusverspreiding via de bodem. Aanwezige bodemschimmels in de grond uit de kas en op de bollen zijn in behandeling F met het fungicide Captan afgedood. In behandeling S is al het bodemleven in de grond via stomen afgedood. *Chenopodium amaranticolor* is vatbaar voor TVX en werd in dit onderdeel als vangplant gebruikt. Tijdens de pottenteelt is TVX aan de bodem toegevoegd via het aangieten met plantensap afkomstig van een virusbesmette tulp. Het optreden van infectie met TVX in *C. amaranticolor* in de verschillende behandelingen is bepaald met een ELISA-analyse op bladmonsters en een TaqMAN PCR-toets voor TVX op mengmonsters van blad resp. wortels (Tabel 3).

C. amaranticolor planten geteeld op potgrond waaraan geen TVX is toegevoegd zijn vrij van TVX. In de *C. amaranticolor* planten die op de TVX-besmette grond zijn geteeld raken in alle behandelingen besmet met TVX. PCR-analyse op wortels resulteerde doorgaans in lagere Cq-waarden dan wanneer bladmonsters werden onderzocht. Hieruit blijkt dat de virusconcentratie in de wortels veel hoger is dan in het bovengrondse gewas. Bij behandeling C en V is de concentratie virus in het blad dermate laag dat de PCR-toets het virus niet of nauwelijks detecteert. Met ELISA-analyse op bladmonsters kon in geen van de behandelingen TVX worden aangetoond. Blijkbaar is de gevoeligheid van de ELISA-toetste laag om deze recente infecties aan te kunnen tonen.

In tegenstelling tot de pottenproef met tulp waar nauwelijks infectie via de bodem werd waargenomen (§3.1), heeft in deze pottenproef met *C. amaranticolor* weldegelijk infectie via de bodem plaatsgevonden. De virusbron was in dit geval vrije virusdeeltjes die aan de bodem via aangieten werden toegevoegd. In alle behandelingen, ook in die waar de bodemschimmels of het totale bodemleven was afgedood, vond infectie plaats. Deze resultaten suggereren een verspreidingsroute van TVX in de bodem zonder tussenkomst van een biologische vector.

Tabel 3. Optreden van infectie met TVX vanuit de bodem bij de vangplant *Chenopodium amaranticolor*. *C. amaranticolor* is geteeld op potgrond en verdachte grond die al dan niet met een fungicide behandeld is of is gestoomd. Een aanvullende virusbron is aangebracht door de grond wekelijks aan te gieten met TVX-besmet plantensap. Optreden van infectie is bepaald met een TaqMAN PCR-toets voor TVX op blad- en wortelmonsters. Een Cq-waarde hoger dan 38 is een negatief toetsresultaat (groen). Een Cq-waarden lager dan 32 is een sterk positief toetsresultaat (rood). Een Cq-waarde tussen 32 en 38 is een zwak-positief toetsresultaat (oranje).

Behandeling	Monstertype	Cq-waarden van drie individuele mengmonsters			Aantal (zwak) positief
Controle (C) (potgrond)	Blad	40.0	40.0	40.0	0
	Wortel	27.8	29.2	29.9	3
Verdachte grond (V)	Blad	38.4	40.0	40.0	0
	Wortel	28.1	28.3	32.4	3
Verdachte grond behandeld met fungicide (F)	Blad	32.4	34.7	37.2	3
	Wortel	24.4	28.1	29.3	3
Verdachte grond gestoomd (S)	Blad	35.6	37.1	38.9	2
	Wortel	28.0	28.3	30.3	3

3.3 Onderzoek in vollegrondskas

De vollegrondskas waar in 2011 zeer waarschijnlijk bodemgebonden verspreiding van TVX heeft plaatsgevonden, is opnieuw voor dit project gebruikt. In deze kas zijn gewassen zoals tulp, lelie en diverse vanggewassen geteeld. Deze gewassen zijn als vier herhalingen in vier blokken in de kas geteeld. De locatie van de individuele herhalingen in de kas worden aangegeven met 'links voor', 'links achter', 'rechts voor' en 'rechts achter'. Controle-opplant van de gebruikte cultivars van tulp heeft plaatsgevonden op potgrond en tijdens reguliere buitenteelt. Aanwezigheid van TVX bij tulp is met ELISA aan het blad bepaald (Tabel 4).

Bij tulp geteeld in de vollegrondskas is op basis van de bladtoets geen infectie met TVX waargenomen. Bij cv. Christmas Dream en Judith Leyster werd geen TVX aangetroffen. Bij cv. Menton bleek een laag percentage TVX aanwezig te zijn. De waargenomen TVX-percentages na teelt in de vollegrondskas op potgrond of op de proeftuin zijn vergelijkbaar met elkaar. Op het moment van uitvoeren van dit onderdeel was nog niet bekend dat PCR-analyse op het ondergrondse deel belangrijk was voor het bepalen van een infectie vanuit de bodem. Daarom is aanvullende PCR-analyse destijds niet uitgevoerd.

Tabel 4. Optreden van infectie met TVX vanuit de bodem bij tulp welke groeide in een vollegrondskas waar in het voorafgaande jaar een partij tulpen zijn geteeld die zwaar besmet was met TVX, zeer waarschijnlijk als gevolg van bodemgebonden virusverspreiding vanuit aanwezige TVX-besmette tulpen. Als controle zijn tulpen van dezelfde partij geteeld op verse potgrond en op de proeftuin. Optreden van infectie is bepaald met ELISA boltoets voor TVX.

Locatie teelt	Cultivar	% TVX (n) op basis van ELISA bladtoets voor individuele veldjes in de vollegrondskas				%TVX (n) totaal
		links voor	links achter	rechts voor	rechts achter	
Vollegrondskas	Christmas Dream	0.0% (25)	0% (20)	0.0% (27)	0.0% (12)	0.0% (74)
	Judith Leyster	0.0% (36)	0% (31)	0.0% (40)	0.0% (32)	0.0% (139)
	Menton	0.0% (40)	3.2% (31)	4.5% (44)	10% (40)	4.6% (151)
Op potgrond in kisten	Christmas Dream					1.0% (99)
	Menton					2.0% (100)
Vollegrondsteelt op proeftuin	Christmas Dream					0.0% (100)
	Judith Leyster					0.0% (100)
	Menton					2.0% (100)

Infectie met TVX bij Lelie, vanggewassen zoals *Chenopodium* soorten en *Nicotiana benthamiana*, en spontaan opgekomen onkruid is bepaald met een TaqMAN PCR-toets voor TVX (Tabel 5).

Bij lelie werd geen infectie met TVX op het blad aangetoond. Pas na uitvoering van dit onderzoek is vanuit onderzoek aan bodemgebonden infectie met PIAMV bij lelie bekend geworden dat PIAMV bij infectie vanuit de bodem zelden tot nooit in hetzelfde teeltseizoen bovengronds aan te tonen is. De gekozen bladmonstering kan daarom achteraf ongeschikt zijn geweest voor het bestuderen van infectie met TVX vanuit de bodem bij lelie.

Met PCR-analyse kon bij de vangplanten *C. amaranticolor* en *C. quinoa* wel infectie met TVX in de wortels worden aangetoond (Tabel 5). De infectie met TVX vanuit de bodem trad alleen op in de rechter helft van de kas. De vangplanten die aan de linker kant van de kas geteeld zijn, bleven vrij van TVX. Bij de vangplant *N. benthamiana* werd geen infectie met TVX aangetroffen.

PCR-analyse aan spontaan opgekomen onkruid bevestigde eerdere infectiemogelijkheden van TVX bij brandnetel. Zowel in een tweejarige plant als in nieuw opgekomen brandnetelplanten kon TVX in de wortels worden aangetoond. Het bovengrondse deel van brandnetel was virusvrij, of de concentratie TVX zat onder de detectiegrens. Spontaan opgekomen rupsklaver en vogelmuur bleek ook besmet te zijn met TVX. TVX kon niet worden aangetoond in perzikkruid. De waardplantenreeks wordt met dit onderzoek verder verbreed.

Wortels van brandnetels en vogelmuurplantjes (beide vanuit de grond in de kas geïnfecteerd geraakt met TVX) en wortels van tulpen uit dezelfde kas zijn gebruikt voor analyse van aanwezigheid van specifieke bodemschimmels in deze wortels.

Bodemschimmels waarvan bekend is dat deze betrokken kunnen zijn bij overdracht van plantenvirussen zijn *Oplidium virulentus* en *O. brassiceae*, *Polymyxa graminis* en *Spongospora subterranea*. Voor *Oplidium* spp. en *Polymyxa* zijn moleculaire detectiemethoden beschikbaar welke zijn gebruikt voor de detectie van deze schimmels in wortels van brandnetel, vogelmuur en tulp. Van deze schimmels kon uitsluitend *O. virulentus* worden aangetoond op de wortels van tulp en brandnetel. Bij vogelmuur waren *Oplidium* schimmels afwezig.

Tabel 5. Optreden van infectie met TVX vanuit de bodem bij lelie, *Chenopodium* soorten en diverse spontaan opkomende onkruiden. De gewassen groeiden in een vollegrondskas waar in het voorafgaande jaar een partij tulpen zijn geteeld die zwaar besmet was met TVX, zeer waarschijnlijk als gevolg van bodemgebonden virusverspreiding vanuit aanwezige TVX-besmette tulpen. Optreden van infectie is bepaald met een TaqMAN PCR-toets voor TVX op blad- en wortelmonsters. Een Cq-waarde hoger dan 38 is een negatief toetsresultaat (groen). Een Cq-waarde lager dan 32 is een duidelijk positief toetsresultaat (rood). Een Cq-waarde tussen 32 en 38 is een zwak-positief toetsresultaat (oranje).

Gewas	Mengmonster van plantnummer	Locatie in vollegrondskas	Cq-waarde
Lelie (cv. Tiber), mengmonster van blad	1 – 20	Rechts voor	No Cq
	21 – 40	Rechts voor	No Cq
	41 – 58	Rechts achter	No Cq
	59 – 76	Rechts achter	No Cq
	77 – 94	Links voor	No Cq
	95 – 111	Links voor	No Cq
	112 – 131	Links achter	No Cq
132 – 150	Links achter	No Cq	
Gewas	Type monster	Locatie in vollegrond kas	Cq-waarde
<i>Chenopodium album</i>	mengmonster van wortels	Links voor	No Cq
		Rechts voor	No Cq
<i>Chenopodium amaranticolor</i>		Links voor	No Cq
		Rechts voor	29.2
<i>Chenopodium quinoa</i>		Links achter	34.0
		Rechts achter	23.0
<i>Nicotiana benthamiana</i>		Links voor	No Cq
		Rechts voor	28.9
		Links achter	No Cq
Brandnetel, 2-jarige plant		mengmonster van wortels	Rechts achter
	Links voor		No Cq
Brandnetel, 1-jarige plant	mengmonster van wortels	Rechts achter	39.4
		Links voor	29.7
Perzikkruid	mengmonster van wortels	Verspreid over de kas	25.3
Rupsklaver			No Cq
Vogelmuur			25.3
Vogelmuur			28.9
Brandnetel, 2-jarige plant	mengmonster van blad	Verspreid over de kas	No Cq
Brandnetel, 1-jarige plant			No Cq
Perzikkruid			No Cq
Rupsklaver			No Cq
Vogelmuur			No Cq
Vogelmuur			No Cq

3.4 Algemene discussie

Het is onduidelijk waarom infectie met TVX bij vangplanten wel heeft kunnen opgetreden en waarom dit bij tulp niet is waargenomen. Zowel in de pottenproef als de teelt in de vollegrondskas raakten de *Chenopodium* planten geïnfecteerd met TVX terwijl de tulp (nagenoeg) vrij bleef.

Mogelijk dat het aan het type wortels ligt. Tulpen maken alleen hoofdwortels. Onkruid en lelie maken daarentegen ook zijwortels en haarwortels. Er zijn daarom bij deze gewassen veel fragielere wortels aanwezig dan bij tulp.

Bij verschillende typen tulp zijn er weer verschillen in type wortelgestel waarbij veel of weinig wortels en fijne en grove wortels aanwezig kunnen zijn.

Het niet kunnen aantonen van bodemgebonden infectie met TVX bij tulp in *dit* onderzoek, doet vooralsnog niet twifelen aan eerdere resultaten beschreven in De Kock e.a. 2012. De resultaten beschreven in dit rapport laten zien dat bodemgebonden infectie met TVX complexer is dan vooraf gedacht. Specifieke bodemomstandigheden kunnen een cruciale rol spelen bij het wel of niet optreden van infectie vanuit de bodem bij tulp. Deze bodemomstandigheden zijn bij tulp blijkbaar kritischer dan bij vangplanten. Daarnaast kan het ook zijn dat cultivarverschillen een rol spelen. Het wordt daarom geadviseerd om zoveel als mogelijk steeds dezelfde cultivars te gebruiken voor onderzoek naar bodemgebonden infectie met TVX.

De combinatie van resultaten over infectie met TVX in verschillende gewassen en de aan- of afwezigheid van potentiële schimmelvectoren maken het niet aannemelijk dat er een direct verband is tussen het optreden van TVX-infectie en de aanwezigheid van een specifieke bodemschimmel (Tabel 6). Dit wordt ondersteund door het feit dat in gestoomde grond waarin al het bodemleven is afgedood, toch nog infectie met TVX bij *C. amaranticolor* kan optreden (§3.2).

Tabel 6. Optreden van infectie met TVX vanuit de bodem en aanwezigheid van specifieke bodemschimmels in de wortels.

Gewas	Infectie vanuit de bodem met TVX	Aanwezigheid <i>Oplidium</i> soorten	Aanwezigheid <i>Polymyxa graminis</i>
Tulp	nee	ja	nee
Brandnetel	ja	ja	nee
Vogelmuur	ja	nee	nee

Plantago asiatica mozaïekvirus (PIAMV) is verwant aan TVX en kan bij lelie virusinfecties veroorzaken. Met lelie/PIAMV zijn vergelijkbare potproeven uitgevoerd zoals beschreven in §3.1. Bij lelie werden destijds in een vergelijkbare proefopzet infectiepercentages gevonden die veel hoger waren dan bij tulp (ca 30% voor behandeling C en V, ca 50% bij behandeling F en bijna 100% bij behandeling S, De Kock e.a. 2013a). Het onderzoek aan PIAMV verspreiding via de bodem suggereerde net als in dit onderzoek dat bij de bodemgebonden virusverspreiding geen vector betrokken is. Dit steunt het resultaat uit dit onderzoek aan bodemgebonden verspreiding van TVX, een zeer verwant virus van PIAMV.

In het onderzoek naar infectie met TVX en PIAMV bij lelie is in 2013 veel kennis opgedaan over waardplantenreeks en besmettelijkheid van de bodem aansluitend op een teelt van een TVX- of PIAMV-besmet gewas. TVX is inmiddels bij een groot aantal waardplanten experimenteel aangetoond:

Tulp	<i>Tulipa</i> spp.	Zwarte nachtschade	<i>Solanum nigrum</i>
Lelie	<i>Lilium</i> spp.	Hanepoot	<i>Panicum crusgalli</i>
Melganzevoet	<i>Chenopodium album</i>	Japanse Haver	<i>Avena strigosa</i>
Kleine brandnetel	<i>Urtica urens</i>	Gele en bruine mosterd	<i>Brassica juncea</i> <i>Sinapis alba</i>
Herderstasje	<i>Capsella pastoris-bursa</i>	Bladrammenas	<i>Raphanus sativus</i> subsp. <i>Oleiferus</i>
(vogel)muur	<i>Stellaria media</i>	Maïs	<i>Zea mays</i>
Klein Kruiskruid	<i>Senecio vulgaris</i>		

In literatuur uit de jaren '80 van de vorige eeuw zijn aanvullende waardplanten voor TVX beschreven. In dit geval zijn de planten handmatig geïnfecteerd met TVX-T. Het is niet bekend of deze planten van nature ook via bodemgebonden virusoverdracht met TVX besmet kunnen raken.

Moeskruid, tamme kervel	<i>Anthriscus cerefolium</i>	Sla	<i>Lactuca sativa</i>
Selderij	<i>Apium graveolens</i>	Tomaat	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Snijbiet	<i>Beta vulgaris</i>	Citroen melisse	<i>Melissa officinalis</i>
Ganzevoet	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Nicotiana benthamiana	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Gierstmelde	<i>Chenopodium quinoa</i>	Peterselie	<i>Petroselinum crispum</i>
Koriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Vlambloem	<i>Plox drumondii</i>
Japanse Peterselie	<i>Cryptotaenia japonica</i>	Naaldenkervel	<i>Scandix pecten-veneris</i>
Komkommer	<i>Cucumis sativus</i>	Spinazie	<i>Spinacia oleracea</i>
Wortel	<i>Daucus carota</i>	Nieuw-Zeelandse spinazie	<i>Tetragonia tetragonioides</i>
Kogelamaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Inkarnaatklaver	<i>Trifolium incarnatum</i>
Strobloem	<i>Helichrysum bracteatum</i>	Maarts viooltje	<i>Viola odorata</i>
Berenklauw	<i>Heracleum sphondylium</i>	Driekleurig viooltje	<i>Viola tricolor</i>

Zie voor meer informatie over dit onderwerp het onderzoeksrapport 'Begrijpen en bestrijden van bodemgebonden verspreiding van PIAMV en TVX' (De Kock e.a. 2013b).

4 Conclusies

- In een pottenproef met aanwezigheid van TVX-besmette tulpen vond er bij tulp zeer beperkt virusverspreiding via de bodem plaats.
- In een pottenproef met TVX-besmette grond vond er bij de vangplant *Chenopodium amaranticolor* infectie met TVX vanuit de bodem plaats.
- Tijdens een teelt in een vollegrondskas met grond met TVX-geschiedenis vond er bij virusvrije tulp geen virusinfectie vanuit de bodem plaats. Daarentegen werd op deze grond wel infectie bij *Chenopodium* vangplanten, brandnetel en vogelmuur waargenomen. Er was dus weldegelijk een virusreservoir in de bodem aanwezig.
- Resultaten laten zien dat er geen bodemorganisme betrokken is bij infectie met TVX vanuit de bodem.
- Bij infectie vanuit de bodem is bij *Chenopodium* en onkruiden TVX het eenvoudigst aan te tonen in een wortelmonster. TVX verspreidt niet snel systemisch in de plant waardoor bladbemonstering ongeschikt is voor het aantonen van recente besmettingen vanuit de grond. Op basis van deze resultaten wordt voor onderzoek naar virusreservoirs bij onkruiden geadviseerd zich met name te concentreren op het ondergrondse deel van de plant.
- De resultaten beschreven in dit rapport laten zien dat bodemgebonden infectie met TVX complexer is dan vooraf werd gedacht. Specifieke bodemomstandigheden kunnen een cruciale rol spelen bij het wel of niet optreden van infectie vanuit de bodem bij tulp. Deze bodemomstandigheden zijn bij tulp blijkbaar kritischer dan bij vangplanten.

5 Praktijkmaatregelen

5.1 Voorkom een besmetting met TVX vanuit de grond

- Verdiep u in de teeltgeschiedenis van percelen die u voor de teelt van tulp gaat gebruiken. Wanneer er in het verleden TVX-besmette bollenteelt heeft gestaan, kunt u met PCR-toets op wortels van verschillende waardplanten TVX bevestigen of er een virusreservoir is op dit perceel aanwezig is.
- Is de virusgeschiedenis van een perceel onbekend en u wilt meer zekerheid over de afwezigheid van virusreservoirs? Gebruik hiervoor dan PCR-toetsen op wortelmateriaal van waardplanten die op dit perceel groeien.
- Diverse groenbemesters zijn waardplant voor TVX (De Kock e.a. 2013b). Overleg met de leverancier van het zaad van de groenbemester in hoeverre hij aandacht heeft voor TVX-productie van dit zaad. Mogelijk weet deze leverancier nog weinig over TVX.
- Vermijd vooralsnog de teelt van tulp op een perceel waar minimaal twee jaar daarvoor TVX-besmette bollen zijn geteeld.
- Bij het testen van wortelmateriaal van onkruid of een groenbemester moet het onkruid minimaal 8 weken oud zijn. Hoe ouder het onkruid of groenbemester is, hoe groter de detectiekans.

5.2 Voorkom de aanleg van virusreservoirs met TVX

- Hou bij een TVX-besmette partij het perceel tijdens de teelt zo goed als mogelijk onkruidvrij. Let daarbij vooral op de onkruiden die waardplant zijn voor deze twee virussen. Voorkom zaadzetting bij (deze) onkruiden.
- Verwijder bij het rooien van een TVX-besmette partij zo veel mogelijk wortelresten uit het perceel.
- Hou aansluitend op de teelt van een TVX-besmette partij het perceel zo goed als mogelijk onkruidvrij. Voorkom ook zaadzetting bij onkruiden. Plant eventueel een groenbemester die *GEEN* waardplant is in plaats van onkruid en zorg voor een gezond bodemleven met voldoende microbiële activiteit. Vatbaarheid van groenbemesters voor TVX is op dit moment een grote onzekerheid en heeft volle aandacht in onderzoek.
- Houd er rekening mee dat TVX besmettingen ook in de kas in de grond achter kunnen blijven en ben alert op onkruid dat de kas voor virusreservoirs kan zorgen. Met stomen kunnen deze besmettingen en onkruiden bestreden worden.
- De waardplantstatus en besmettelijkheid van grasland voor TVX is momenteel nog onbekend. Een gerichte analyse naar de aanwezigheid van TVX bij grasland op een perceel waarop voorafgaand TVX-besmette tulpen zijn geteeld, kan meer informatie opleveren. Bij onderzoek naar de aanwezigheid van TVX in alternatieve waardplanten wordt geadviseerd PCR-diagnostiek op wortelmateriaal toe te passen.

6 Geraadpleegde documenten

- De Kock, M., Geerlings, M., Lemmers, M., & Van Schadewijk, T. (2010) Onderzoek naar symptoomloos TVX. PT project 13632.
- De Kock M., Kok H., Van Aanholt, H., Lemmers, M., Lommen, S., Pham, K., Hollinger, T., De Boer, A. & Slootweg, C. (2013a) Aanvullend onderzoek naar verspreidingsroutes en mogelijkheden voor beheersing van PIAMV. PT-project 14483.
- De Kock, M., Lommen, S., Lemmers, M., Pham, K., en Martin, W. (2012) Onderzoek naar verspreiding van TVX via water, mijten en bodemgebonden vectoren. PT project 13630.
- De Kock, M., Slootweg, C., Van Aanholt, H., Lemmers, M., Pham, K., Dees, R., De Boer, A. & Hollinger, T. (2013b) Begrijpen en bestrijden van bodemgebonden verspreiding van PIAMV. PT project 14774.
- De Kock, M., Van Dam, M., Geerlings, M., Lemmers, M., Stijger, I., Conijn, C (2008) Beperken van verspreiding van Tulpenvirus X in tulpen - een zoektocht naar de verschillende manieren van TVX verspreiding. PT project: 12271.
- De Kock, M., Van Dam, M., Lemmers, M. (2009) Onderzoek naar mechanische verspreiding van Tulpenvirus X onder praktijkomstandigheden. PT project 13062.
- Alfaro-Fernández, A., Del Carmen Córdoba-Sellés, M., Herrera-Vásquez, J., Cebrián, M. d. C. and Jordá, C. (2010), Transmission of Pepino mosaic virus by the Fungal Vector *Oplidium virulentus*. Journal of Phytopathology, 158: 217–226.