

Wordt nerfstrepenziekte in tulpen door een virusbesmetting veroorzaakt?

Voortgezet diagnostisch onderzoek 2011

Peter Vink, Khanh Pham en Miriam Lemmers

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, 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 341021 91 PT projectnummer: 13891-09

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252-462121

Fax : 0252-462100

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1. SAMENVATTING	5
2. INLEIDING.....	7
3. UITVOERING VAN HET ONDERZOEK.....	7
4. RESULTATEN EN DISCUSSIE.....	9
5. CONCLUSIES EN REFERENTIES	12

Samenvatting

Nerfstrepenziekte in tulpen is een verschijnsel waarbij de planten te kort blijven, de bladeren soms krom en gedraaid groeien en necrotische strepen zichtbaar zijn rond de nerven nabij de bladoksels. Daardoor ontstaat soms veel economische schade. Bij nerfstrepenziekte wordt vanuit oud virologisch onderzoek vermoed dat sprake is van een besmetting met het tobacco ringspot virus (TRSV) zonder dat een directe relatie voldoende duidelijk is aangetoond. Intussen zijn de detectietechnieken om virussen aan te tonen de laatste jaren aanzienlijk gevoeliger en beter geworden zodat er meer mogelijkheden bestaan om te achterhalen welk virus mogelijk een rol speelt bij de verschijnselen van nerfstrepenziekte.

In het broeiseizoen 2010/2011 werden verschillende monsters tulpen met verschijnselen van nerfstrepenziekte aangeboden voor diagnostisch onderzoek. Dit leek een goed moment om nog eens na te gaan of werkelijk sprake was van een virusbesmetting. Daartoe zijn 12 verschillende monsters tulpen verzameld en met behulp van PCR-technieken getoetst op aanwezigheid van virussen. Daarnaast is plantensap uit een aantal monsters tulpen verzameld en op zogenaamde toetsplanten aangebracht zodat een eventuele virusbesmetting zichtbaar gemaakt kon worden.

Het bleek dat zowel met PCR-technieken als met behulp van het toetsplantenonderzoek geen enkele relatie tussen symptomen van nerfstrepenziekte en de aanwezigheid van TRSV kon worden aangetoond.

Dit is voor ons dan ook een zeer serieuze aanwijzing dat het vermoeden van een virusbesmetting bij nerfstrepenziekte niet juist is. Wat wel de oorzaak is van het ontstaan van symptomen van nerfstrepenziekte lijkt meer in de richting van een fysiologische afwijking gezocht te moeten worden. Alleen nader onderzoek kan daarover meer duidelijk verschaffen.

1 Inleiding

Bij de broei van tulpen komen elk jaar regelmatig problemen voor met de zogenaamde nerfstrepenziekte. Daarbij blijven de tulpen te kort, groeien de bladeren soms krom en gedraaid uit en zijn necrotische strepen zichtbaar rond de nerven nabij de bladoksels. Als gevolg van genoemde symptomen hebben de tulpen geen handelswaarde en wordt dus economische schade geleden. Bij nerfstrepenziekte wordt vanuit oud virologisch onderzoek vermoed dat sprake is van een besmetting met het tobacco ringspot virus (TRSV) zonder dat een directe relatie voldoende duidelijk is aangetoond. Daarnaast spelen de teeltomstandigheden (vocht en koude) een rol bij het ontstaan van de symptomen.

In het broeiseizoen 2010/2011 werden bij Diagnostiekservice van PPO verschillende monsters tulpen met symptomen van nerfstrepenziekte aangeboden voor diagnostisch onderzoek. Dit leek een goed moment om nog eens nader onderzoek te doen of nerfstrepenziekte verband houdt met een virusbesmetting, zeker nu de laatste jaren de detectietechnieken voor het aantonen van virussen aanzienlijk beter en gevoeliger zijn geworden.

2 Uitvoering van het onderzoek

Via BKD en Diagnostiekservice van PPO zijn een 7-tal geschikte monsters tulpen verzameld met duidelijke symptomen van nerfstrepenziekte in het blad. Van al deze monsters zijn mengmonsters gemaakt van het blad en voor enkele monsters ook van het bolweefsel voor verdere analyse. Een deel van het plantmateriaal is ingevroren bij -20°C om te conserveren.

RNA isolatie en Realtime-PCR

RNA isolaties zijn per tulpenmonster uitgevoerd m.b.v. Qiagen RNeasy Plant mini kit. Per monster is aansluitend een aantal specifieke PCR-toetsen uitgevoerd waarbij naast het tobacco ringspot virus (TRSV) ook op andere nepovirussen zoals arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tomato black ring virus (TBRV) en tomato ringspot virus (ToRSV) is getoetst. Tevens is generiek getoetst op nepovirussen van de subgroepen A, B en C en op de zogenaamde potexvirussen. Om de hoeveelheid toetsingen beperkt te houden werden meng RNA's gebruikt voor de specifieke toetsingen van ArMV, SLRSV, TBRV, ToRSV en generieke toetsing van potexvirussen.

Voor een aantal monsters zijn de sequenties van PCR producten bepaald en geanalyseerd.

Tabel 1: Overzicht monsters tulpen voor RNA isolatie

Nr.	Code
1	BKD1
2	BKD2
3	BKD3
4	BKDbol
5	PPO1
6	PPO2
7	BASF1
8	BASF2
9	GAM1
10	GAM2
11	GAM1bol
12	GAM2bol

Tabel 2: Overzicht van PCR Toetsen

Nr.	Aantonen	Virus	Amplicon (bp)	Referentie
1	Specifiek TRSV	<i>Tobacco ringspot nepovirus</i>		(1)
2	Specifiek ArMV, Set1	<i>Arabis mosaic nepovirus</i>	1088	(2)
3	Specifiek ArMV, Set2	<i>Arabis mosaic nepovirus</i>	340	(3)
4	Specifiek SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i>	ca. 900	(4)
5	Specifiek TBRV	<i>Tomato black ring nepovirus</i>	ca. 800	(4)
6	Specifiek ToRSV	<i>Tomato ringspot nepovirus</i>	ca. 800	(4)
7	Specifiek TVX, Q-PCR	<i>Tulip X potexvirus</i>		(5)
8	Generiek Potex	<i>Potexvirus</i>		(6)
9	Generiek NepoA	<i>Nepovirus subgroep A</i>	ca. 340	(7)
10	Generiek NepoB	<i>Nepovirus subgroep B</i>	ca. 250	(7)
11	Generiek NepoC	<i>Nepovirus subgroep C</i>	ca. 640	(8)

In een kasafdeling van PPO zijn planten van *Chenopodium quinoa* en *Nicotiana occidentalis* als toetsplant opgekweekt.

Plantensap is uit de verschillende ingevroren tulpenmonsters geperst en volgens vast protocol aangebracht op de genoemde toetsplanten om de eventueel in het monstermateriaal aanwezige virussen zichtbaar te kunnen maken. Na een voldoende lange incubatieperiode zijn alle geïnoculeerde toetsplanten visueel beoordeeld op virussyptomen.

3 Resultaten

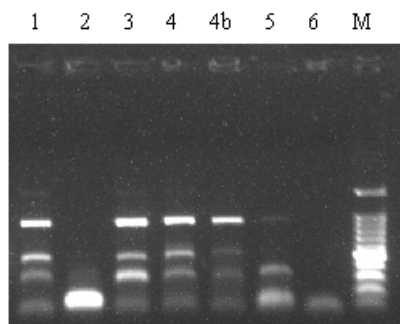
Toetsing van meng RNA

Het bleek (zie onderstaande overzicht in Tabel 3) dat geen ArMV, SLRV, TBRV of TRSV in de tulpenmonsters kon worden aangetoond. Alleen in 1 tulpenmonster (PPO nr. 2) kon een potexvirus worden aangetoond wat TVX bleek te zijn. Alle positieve en negatieve controles waren correct.

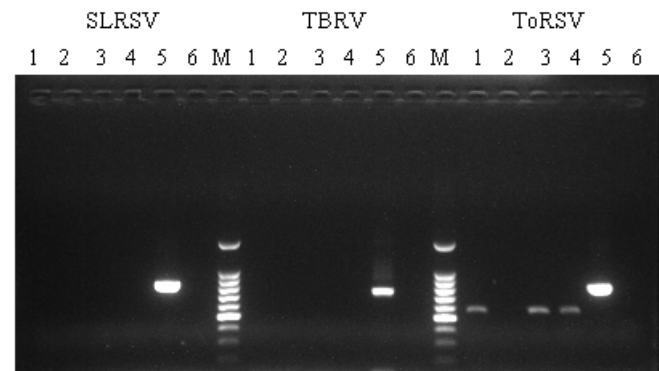
Tabel 3: PCR resultaten voor toetsing meng-RNA op ArMV, SLRSV, TBRV, ToRSV en Potexvirussen

Nr.	Code	ArMV, set1	ArMV, set2	SLRSV	TBRV	ToRSV	Potex
		Not shown	Fig. 1	Fig. 2	Fig. 2	Fig. 2	Not shown
1	BKD	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	PPO	neg	pos (*)	neg	neg	neg	pos
3	BASF	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	GAM	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	Positive controle	pos	neg	pos	pos	pos	pos
6	Negatieve controle	neg	neg	neg	neg	neg	neg

(*) PCR product is kleiner dan verwacht, is ook opgestuurd voor sequentie analyse.



Figuur 1. PCR resultaten van de toetsing op ArMV, 4b is RNA uit bolmateriaal geïsoleerd.



Figuur 2. PCR resultaten van de toetsing op SLRSV, TBRV en ToRSV.

Toetsing van RNA uit Tabel 1

RNA uit alle monsters van Tabel 1 werden gebruikt voor toetsing op TRSV, specifieke PCR op TVX en voor toetsing met generieke primers voor verschillende nepovirus-subgroepen.

Subgroep A = o.a. ArMV, GFLV, TRSV;

Subgroep B = o.a. TBRV, GCMV en

Subgroep C = o.a. ToRSV

Het bleek (zie onderstaande overzicht in Tabel 4) dat een zwak positief signaal werd gevonden bij de monsters nr. 1, 4 en 5 voor het tobacco ringspot virus. Voor de monsters met nummer 4, 11 en 12 werd een duidelijk positief signaal voor Nepovirusen uit de subgroep B vastgesteld. Daarom zijn de sequenties van PCR-producten uit de monsternummers 1, 4, 5 en 11 bepaald en geanalyseerd. Daarbij bleek (zie tabel 5) dat er geen match was met een plantenvirus.

Bij de monsters nr. 5 en 6 was sprake van een positief signaal voor TVX. Dit werd ook bevestigd door een positieve reactie in een ELISA-toets van monster nr. 5.

Alle positieve en negatieve controles waren correct.

Tabel 4: PCR resultaten voor toetsing op TRSV, TVX en nepovirus-subgroepen

Nr.	Code	TRSV	TVX, Q-PCR	NepoA	NepoB	NepoC
		Not shown	Bijlage 1/Fig.5	Not shown	Not shown	Not shown
1	BKD1	pos (*)	neg	neg	neg	neg
2	BKD2	neg	neg	neg	neg	neg
3	BKD3	neg	neg	neg	neg	neg
4	BKDbol	pos (*)	neg	neg	pos (***)	neg
5	PPO1	pos (*)	pos (**)	neg	neg	neg
6	PPO2	neg	pos (**)	neg	neg	neg
7	BASF1	neg	neg	neg	neg	neg
8	BASF2	neg	neg	neg	neg	neg
9	GAM1	neg	neg	neg	neg	neg
10	GAM2	neg	neg	neg	neg	neg
11	GAM1bol	neg	neg	neg	pos (***)	neg
12	GAM2bol	pos	neg	neg	pos (***)	neg
13	Positieve controle	geen	pos/pos	geen	pos	pos
14	Negatieve controle	neg	neg	neg	neg	neg

(*) zwak signaal, re-amplificatie is toegepast en opgestuurd voor sequentie analyse.

(**) Met ELISA is alleen monster PPO1 TVX positief.

(***) PCR product is groter dan verwacht, is ook opgestuurd voor sequentie analyse.

Sequentie analyse

Tabel 5: Resultaten sequentie analyses

Nr.	Fragment code	Identiteit volgens Blast search analyse
1	2PPOA	Geen sequentie van plantenvirus
2	1BKDT	Geen sequentie van plantenvirus
3	4BKDBolT	Geen sequentie van plantenvirus
4	5PPOT	Geen sequentie van plantenvirus
5	11GAMBolT	Geen sequentie van plantenvirus

Toetsplantenonderzoek

Bij het toetsplantenonderzoek met zowel *Chenopodium quinoa* als *Nicotiana occidentalis* bleek dat bij alle getoetste tulpenmonsters zich geen virussymptomen ontwikkelden in en op het blad van de toetsplanten. Er werd dan ook geen enkele relatie tussen symptomen van nerfstrepenziekte in tulpen en de aanwezigheid van het tobacco ringspot virus aangetoond.

4 Discussie

Uit tulpenplanten met karakteristieke symptomen van nerfstrepenziekte is RNA geïsoleerd en zijn specifieke en generieke PCR-toetsen uitgevoerd. Daarbij werden bij een aantal monsters zwakke of juist extreme signalen gevonden voor de aanwezigheid van een virus (zie tabel 3 en 4). Na re-amplificatie en sequentie-analyse van deze monsters bleek dat er volgens de Blast search analyse geen sprake was van een plantenvirus. Daarmee is het duidelijk geworden dat met de huidige zeer nauwkeurige PCR-detectietechnieken geen serieuze aanwijzingen zijn gevonden dat nerfstrepenziekte bij tulpen door het tobacco ringspot virus wordt veroorzaakt. Ook is gebleken dat geen sprake is van besmetting met andere Nepovirussen. Omdat nu op een ruim aantal nepovirussen en op potexvirussen is getoetst lijkt het onwaarschijnlijk dat nerfstrepenziekte door een virusbesmetting wordt veroorzaakt. Daarmee ontstaat natuurlijk direct de vraag waardoor nerfstrepenziekte in tulpen dan wel wordt veroorzaakt. Daar is in het kader van dit onderzoek niet nader naar gekeken omdat dit buiten het bestek van het onderzoek viel. Op basis van vele ervaringen en diagnostisch onderzoek uit het verleden is bekend dat te natte en een te koude grond sturend zijn bij het ontstaan van nerfstrepenziekte. Gecombineerd met het nu uitgevoerde onderzoek lijkt het er dus sterk op dat nerfstrepenziekte bij tulpen uitsluitend wordt veroorzaakt en bepaald door fysiologische factoren en niet door een ziekteverwekker.

5 Conclusies

- in alle tulpenmonsters met symptomen van nerfstrepenziekte is middels PCR-technieken of toetsplantenonderzoek geen tobacco ringspot virus aangetoond
- ook zijn geen positieve reacties gevonden bij toetsing met specifieke primers voor ArMV, SLRSV, TBRV, ToRSV en TRSV
- bij toetsing met generieke primers voor nepovirussen van verschillende subgroepen werden er ook geen positieve reacties gevonden
- TVX is aangetoond in 2 PPO monsters (ook met Elisa)
- de sequenties van verkregen PCR producten bleken geen sequenties te zijn van plantenvirussen
- daarmee lijkt het vrijwel zeker dat nerfstrepenziekte in tulpen niet door een virusbesmetting wordt veroorzaakt

6 Referenties

- (1) Martin, R.R., Pinkerton, J.N. and Kraus, J. 2009. The use of collagenase to improve the detection of plant viruses in vector nematodes by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 155:91-95.
- (2) Scientific Report 2008 FES Consortium Plant Virus- Nepovirus.
- (3) Bertolini, E., A. Olmos, M. C. Martinez, M. Gorris, and M. Cambra. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods* 96:33-41.
- (4) Scientific Report 2010 FES Consortium Plant Virus- Nepovirus.
- (5) PPO-PPF, Wageningen UR, 2011.
- (6) Van der Vlugt RAA, Berendsen, M. 2002. Development of a general potexvirus detection method. *European Journal of Plant Pathology* 108:367-371.
- (7) Wei T., Clover G. Use of primers with 5' non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. 2008. *Journal of Virological Methods*, 153 (1):16-21.
- (8) Digiario M, Elbeaino T, Martelli GP. 2007. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *J Virol Methods* 141:34-40.
- (9) C. J. Asjes. Tulip veinal streak, a disorder probably caused by tobacco ringspot virus. *Neth. J. Pl. Path.* 78 (1972) 19-28.