

Onderzoek naar mogelijke TBV-reservoirs in onkruid

Maarten de Kock, Miriam Lemmers, Annette Dullemans & Khanh Pham

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361501 00/ PT nr. 14744
April 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, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

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

PPO Projectnummer: 32 361501 00
PT Projectnummer: 14744



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

Address : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : +31 252 46 21 48
Fax : +31 252 46 21 00
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Contents

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Opzet van het onderzoek.....	7
2 SELECTIE VAN REGIO'S VOOR ONDERZOEK.....	9
3 BLADLUIZENVANGSTEN	11
3.1 Werkwijze.....	11
3.2 Resultaten.....	12
4 ANALYSE AANWEZIGHEID TBV IN GEVANGEN BLADLUIZEN.....	15
4.1 Toetsontwikkeling	15
4.2 Analyse bladluizenvangst 2011 op aanwezigheid PVY – <i>proof of concept</i>	16
4.2.1 Achtergrond	16
4.2.2 Werkwijze en resultaten.....	16
4.3 Analyse bladluizenvangst 2011 op aanwezigheid PVY	17
4.3.1 Werkwijze en resultaten.....	17
4.4 Analyse bladluizen 2012 op aanwezigheid TBV.....	17
4.4.1 Werkwijze.....	17
4.4.2 Resultaten	18
4.5 Conclusies	18
5 ANALYSE ONKRUID OP AANWEZIGHEID VAN TBV	21
5.1 Werkwijze en resultaten.....	21
5.2 Conclusies en aanbevelingen	21
6 ALGEMENE CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN.....	23
7 GERAADPLEEGDE LITERATUUR.....	25

Samenvatting

In tulpen veroorzaakt het potyvirus tulpenmozaïekvirus (TBV) van alle virussen de meeste directe schade (visuele virussymptomen en opbrengstverlies) en indirecte schade (keuringsmaatregelen, beheersingsmaatregelen, etc.). Dit virus wordt door bladluizen verspreid. Om een virusvrije teelt optimaal mogelijk te maken is kennis over het beperken van virusverspreiding *binnen* een partij / veld van eerste belang (dit blijkt uit onderzoek van laatste decennia). Dit onderzoeksproject geeft aandacht aan een ontbrekend puzzelstukje, kennis over de potentiële gevaren die vanuit de omliggende groene ruimte / natuur de teelt van tulp schade aan kunnen brengen.

In dit project is onderzoek gedaan naar aanwezigheid van TBV in bladluisvluchten en onkruiden welke verzameld zijn in teeltregio's van tulp waar in het verleden aanwijzingen/suggesties waren voor onverklaarbare toename van TBV in partijen tulp. In dit project zijn in 2012 op twee locaties gedetailleerde bladluisvangsten uitgevoerd en op 9 locaties zijn onkruidmonsters verzameld. Daarnaast is een collectie bladluizen gevangen in 2011 in de omgeving van Lelystad voor dit onderzoek gebruikt. De gevangen bladluizen en de onkruidmonsters zijn onderzocht op aanwezigheid van TBV. Dit project heeft tot de volgende conclusies geleid:

- Pas bij de echte temperatuurstijging in de tweede helft van mei 2012 kwam een grote bladluizenvlucht op gang. Per dag werden er met één fuik tientallen tot zelfs een paar honderd bladluizen gevangen.
- Er is aangetoond dat er grote verschillen in omvang van bladluizenvluchten kunnen zijn. Stel dat op beide locaties een vergelijkbare partij met 1% TBV werd geteeld, dan was het risico op virusverspreiding door bladluizen vanwege verschil in aantallen bladluizen op locatie B 2,5x zo groot als op locatie A.
- Tientallen bladluizen gevangen in de omgeving van Lelystad, 290 bladluizen gevangen in Dirkshorn en ruim 700 bladluizen gevangen in Aartswoud, zijn met PCR-diagnostiek onderzocht op aanwezigheid van TBV. Met behulp van de toegepaste onderzoeksmethoden zijn er geen aanwijzingen gevonden dat gevangen bladluizen TBV bij zich hadden.
- Analyse op aanwezigheid van TBV in onkruiden op percelen die in het verleden in verband zijn gebracht met onverwachte toename aan TBV heeft niet geresulteerd in de identificatie van TBV-geïnfecteerde onkruiden.

Het feit dat er geen TBV in de gevangen bladluizen is aangetoond, en dat er geen TBV in onkruidmonsters is aangetoond, doet vermoeden dat er vooralsnog geen infectiebron is voor TBV anders dan tulp. Voor de tulpensector is dit een hoopgevend resultaat.

1 Inleiding

In tulpen veroorzaakt het potyvirus tulpenmozaïekvirus (TBV) van alle virussen de meeste directe schade (visuele virussymptomen en opbrengstverlies) en indirecte schade (keuringsmaatregelen, beheersingsmaatregelen, etc.). Onderzoek heeft laten zien dat virusverspreiding door bladluizen al veel vroeger in het seizoen optrad dan aanvankelijk werd gedacht. Op basis van verkregen resultaten werd gesteld dat risico op virusverspreiding (en dus vliegende bladluizen) kon gaan optreden zodra de temperatuur boven de 13°C uit kwam. In het verleden werd deze grens op 15°C gelegd. Deze resultaten hebben geleid tot aangepaste adviezen voor bescherming tegen virusoverdracht door bladluizen (De Kock et al 2009a, 2009b). Opvallend is dat bij deze vroege virusverspreiding het tulpengewas dan nog jong is en er slechts beperkte aantallen vliegende bladluizen worden waargenomen. Er leven twee belangrijke vragen over hoe deze vroege virusverspreiding heeft kunnen plaatsvinden:

- Wat kan zo vroeg in het seizoen de virusbron vormen? De virusconcentratie is immers in strekkende tulpenplanten nog erg laag. Virusgeïnfecteerde tulpen kunnen dan nog moeilijk als infectiebron optreden.
- Welke soorten bladluizen zijn betrokken bij deze virusverspreiding en zijn deze vroege soorten misschien al besmet met virus? Er worden in een tulpenveld vroeg in het seizoen nog maar beperkte aantallen bladluizen gevangen.

Vanuit de praktijk zijn bij zowel tulp, lelie als aardappel diverse praktijkvoorbeelden dat gedurende een teeltseizoen in een virusvrij perceel toch aanzienlijke infecties met potyvirussen optreden (TBV bij tulp, leliemozaïekvirus bij lelie en aardappelvirus Y (PVY) bij aardappel). De partij zelf, evenals belendende partijen zijn bij deze voorbeelden virusvrij/virusarm. Het is dan niet ondenkbaar dat in dergelijke gevallen de virusbron elders buiten de bollen- of knollenteelt aanwezig zou moeten zijn. Inzicht in deze risico's ontbreekt echter.

Recent onderzoek door Van der Vlucht en collega's (2012) heeft aangetoond dat er inderdaad in een aardappelveld van buitenaf PVY-besmette bladluizen kunnen invliegen. Deze bladluizen hebben PVY waarschijnlijk opgenomen uit bronnen buiten het perceel anders dan aardappel (er waren geen aardappelpercelen in de omgeving) en zorgen zo voor een virusinflux in een aardappelpartij. Deze conclusie werd ondersteund door de waarneming dat er al PVY-positieve bladluizen gevangen werden voordat het aardappelpgewas bovengronds kwam. In dit onderzoek zijn diverse onkruiden positief getoetst voor PVY. Hiertoe behoorden o.a. kruiskruid, melganzevoet, paardenbloem, weegbree-soorten, akkerkers en melkdistel. Onkruiden spelen zeer waarschijnlijk een grotere rol in de verspreiding van PVY dan tot nu toe werd gedacht.

Om een virusvrije teelt optimaal mogelijk te maken is kennis over het beperken van virusverspreiding *binnen* een partij / veld van eerste belang (onderzoek van laatste decennia). Dit onderzoeksproject geeft aandacht aan een ontbrekend puzzelstukje, kennis over de potentiële gevaren die vanuit de omliggende groene ruimte / natuur de teelt van tulp schade aan kunnen brengen.

1.1 Opzet van het onderzoek

Het project is in vier onderdelen te verdelen:

1. Selectie van regio's waar in het verleden onverklaarbare infecties met TBV hebben plaatsgevonden (en dus waar mogelijk TBV-reservoirs in de groene ruimte aanwezig zijn).
2. Op twee geselecteerde locaties zijn speciale bladluizenfinken geplaatst en zijn gedurende de periode maart t/m juni 2012 bladluizen gevangen.
3. Gevangen bladluizen uit tulpenregio's zijn onderzocht op de aanwezigheid van TBV. Daarnaast zijn ook bladluizen uit het onderzoek aan PVY-besmette bladluisvluchten onderzocht op aanwezigheid van TBV.
4. Op negen geselecteerde locaties zijn onkruidmonsters verzameld en onderzocht op de aanwezigheid van TBV.

2 Selectie van regio's voor onderzoek

Via contacten met besturen van de KAVB, tulpentelers en teeltadviseurs zijn ervaringen met onverwachte virusopbouw in kaart gebracht. In dit rapport zullen namen van ondernemers en cultivars niet genoemd worden. Wel worden enkele ervaringen op een rijtje gezet:

Ondernemer 1, teelt in NO-polder

Enkele partijen van cv. Tulp1 van 0%, 0.5% en 1% gingen in 2011 in één seizoen naar 13-14% TBV. Daarnaast een partij cv. Tulp2 die in één seizoen van 3% naar 34% TBV is gegaan. Ondernemer heeft zelf het idee dat de hele vroege bladluizendruk de oorzaak zou zijn van deze virustoename. Onderzoek door Van der Vlugt en collega's (2012) liet echter zien dat in Flevoland pas op 22 april 2011 de eerste bladluizen werden gevangen.

Ondernemer 2, teelt op diverse locaties

Diverse ELISA-cultivars worden geteeld. Tot en met 2010 was het viruspercentage meestal 0-1% TBV. In 2011 geen verandering spuitschema: zodra groen uit de grond een wekelijks schema met alleen pyrethroïde. Volgens de ondernemer zijn er geen virusbronnen in de directe omgeving, ook is onkruid op de percelen zelf geen probleem. In 2011 heeft op alle percelen virustoename plaatsgevonden, behalve op een perceel waar vaste beregening werd toegepast (ondereind stond op dit perceel). De andere percelen zijn 8-9x beregend met een haspel waarbij veel water in korte tijd over de tulpen wordt gesproeid met groot risico voor afspoelen van middelen. Bij vaste beregening is er een veel gelijkmatiger dosering van water en minder afspoelen.

Ondernemer 3, teelt op diverse locaties

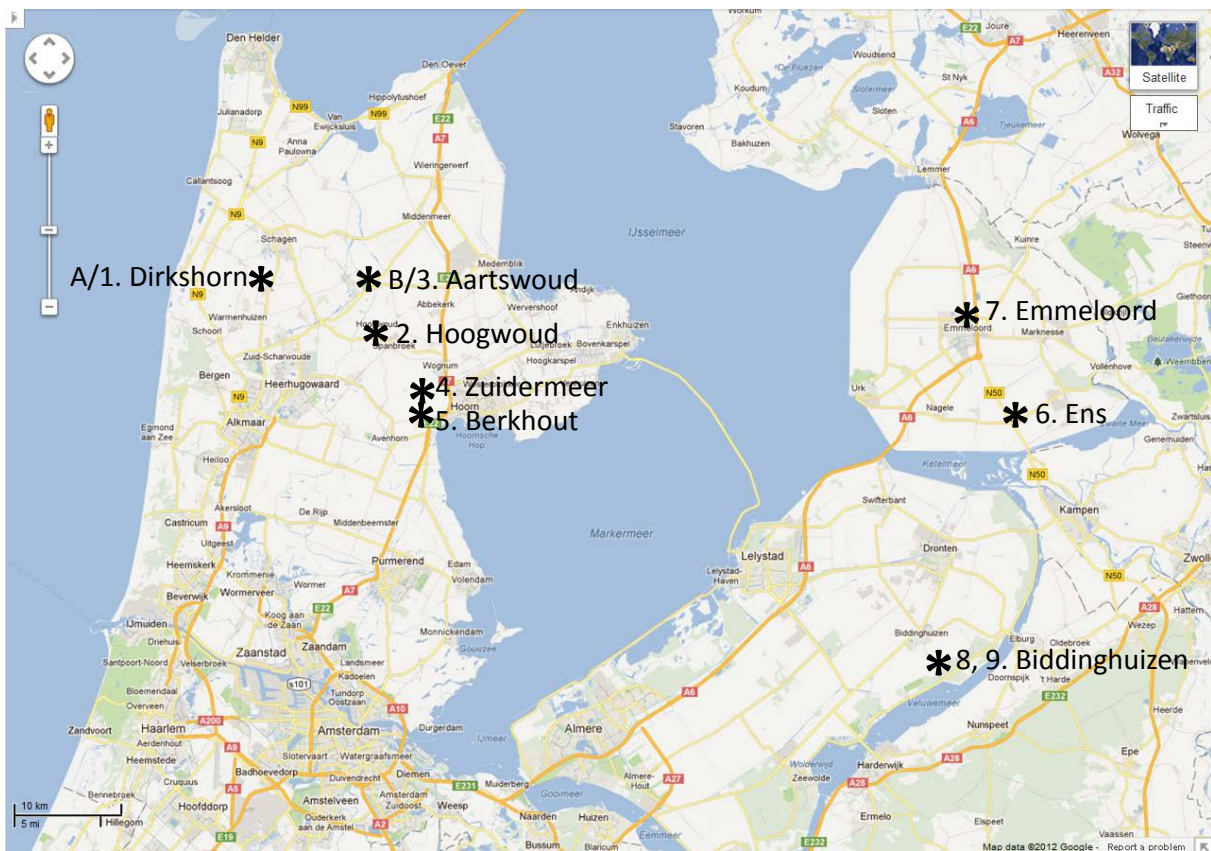
Deze ondernemer heeft ervaringen met ongewone toename van virus in tulp en lelie. Vaak is het onverklaarbaar. De ondernemer heeft vooral teleurstellingen met de teelt ondervonden in de buitengebieden. Vaak zie je daar de teelt tussen bossen, maisvelden, weidepercelen, etc. In de randen van deze percelen, zie je vaak enorme onkruidgroei. Maar de ondernemer kan als contractgever niet een werkelijke oorzaak noemen, want hij heeft geen volledig inzicht of controle op andere cultuurmaatregelen. De ondernemer hoort deze geluiden vaak meer.

Op basis van deze en enkele andere contacten zijn twee locaties voor de bladluizenfukken geselecteerd die in het verleden in verband zijn gebracht met onverwachte toename aan TBV (zie ook Figuur 1). Op deze percelen ging het percentage TBV in één seizoen van 1% naar 5% TBV.

- A. Nabij de spoordijk langs de N241 bij Blokhuisen. Gedurende 2012 werd dit perceel voor grasland en koeien gebruikt. Er was geen tulpenteelt in de nabije omgeving.
- B. Zuiderzeestraat bij Aarstwoud. Gedurende 2012 werd dit perceel voor maïsteelt gebruikt. Er was geen tulpenteelt in de nabije omgeving.

Onkruidmonsters zijn verzameld op de volgende negen locaties (zie ook Figuur 1). Deze locaties zijn in het verleden in verband gebracht met onverwachte toename aan TBV.

1. Perceel aan de spoordijk langs de N241 bij Dirkshorn/Blokhuisen (locatie bladluisfuk 1)
2. Perceel aan de Koningskade nabij Hoogwout (onverklaarbare TVX-infectie op dit perceel in 2011)
3. Perceel aan de Zuiderzeestraat bij Aarstwoud (locatie bladluisfuk 2)
4. Perceel aan de Baarsdorpermeer, nabij Zuidermeer
5. Perceel aan de Veldhuizerweg nabij Berkhout
6. Perceel aan de Neushoornweg, nabij Ens
7. Perceel aan de N451 tussen Emmeloord en Luttelgeest
8. Perceel aan de Kokkelweg nabij Biddinghuizen
9. Perceel aan de Mosselweg nabij Biddinghuizen



Figuur 1. Locaties voor de bladluizenfukien (A en B) en de locaties waar onkruidmonsters verzameld zijn voor analyse op TBV in onkruid (1 t/m 9).

3 Bladluizenvangsten

3.1 Werkwijze

Er is gebruik gemaakt van bladluisfuiken om vliegende bladluizen te vangen. Een fuik bevat een trechter van gaasdoek waaraan aan het smalle uiteinde een opvangbus is geplaatst (Figuur 2). Deze opvangbus heeft een bodem van gaasdoek en is luchtdoorlatend. Hierdoor worden insecten opgevangen in de bus, maar de wind kan door de trechter en de opvangbus waaien. De trechter met opvangbuis is gemonteerd op een windvaan. Door middel van deze windvaan is de opening van de trechter altijd in de wind gericht.

Om virus in bladluizen aan te kunnen tonen is het belangrijk dat de bladluizen binnen 24 uur nadat ze in de bladluizenfuik zijn gevangen, in 70% alcohol worden gefixeerd en bij -20°C worden bewaard tot aan analyse met PCR. Er is gekozen om vanaf week 13 t/m week 23 per week twee dagen achter elkaar bladluizen te oogsten. Om 2x per week te kunnen bemonsteren, werden er drie opeenvolgende dagen de volgende handelingen uitgevoerd:

- Dag 1 plaatsen opvangbus 1
- Dag 2 oogsten opvangbus 1, plaatsen opvangbus 2
- Dag 3 oogsten opvangbus 2

Bladluizenfuiken hebben vanaf week 13 t/m week 23 gestaan nabij de spoordijk langs de N241 bij Dirkshorn/Blokhuizen (locatie A) en aan bij de Zuiderzeestraat bij Aarstwoud (locatie B). Het oogsten van de bladluizen is uitgevoerd door collega's van Albert Groot bv (Schagerbrug).





Figuur 2. Bladluizenfuiken geplaatst bij de spoordijk langs de N241 bij Dirkshorn/Blokhuizen (linksboven), en in een perceel aan de Koningskade nabij Hoogwout (rechtsboven). De bladluizenfuike bestaat uit een trechter van gaasdoek (rechtsonder) die overgaat in een luchtdoorlatende opvangbus. Het geheel is op een met de wind mee draaiende windvaan geplaatst.

3.2 Resultaten

Per vangstmoment is het aantal bladluizen geteld (Tabel 1). In deze tabel zijn voor de vangstdagen ook diverse meteogegevens opgenomen. Deze meteogegevens zijn afkomstig van een Dacom-meetunit bij de Oostwaardhoeve te Slootdorp. De afstand tussen de meetunit en de locaties van de bladluizenfuiken is 12-18 km.

Het is opvallend dat tot en met week 20 (16 mei 2011) op beide locaties niet of nauwelijks bladluizen zijn gevangen. In eerder onderzoek werd in 2006 op locatie Nieuw-Tonge pas vanaf de eerste week van juni wekelijks aantallen bladluizen gevangen. Daarentegen werden in 2007 in Lisse en Nieuw-Tonge vanaf de eerste week van mei wekelijks bladluizen gevangen (De Kock et al 2009a, 2009b).

Gemiddelde dagtemperaturen bleven dat tot en met week 20 (16 mei 2011) ook onder de 15 °C. Maximumtemperaturen kwamen gedurende de dagen begin mei wel regelmatig boven de 13-15°C. Pas bij de echte temperatuurstijging in de tweede helft van mei is een grote bladluizenvlucht op gang gekomen. Per dag werden er met één fuike tientallen tot zelfs een paar honderd bladluizen gevangen. Op locatie A (Dirkshorn) zijn in totaal 290 bladluizen gevangen. Op locatie B (Aartswoud) zijn 709 bladluizen gedurende dezelfde periode gevangen. Deze resultaten tonen aan dat er grote verschillen in omvang van bladluizenvluchten kunnen zijn.

Stel dat op beide locaties een vergelijkbare partij met 1% TBV werd geteeld, dan was het risico op virusverspreiding door bladluizen vanwege verschil in aantallen bladluizen op locatie B 2,5x zo groot als op locatie A.

Tabel 1. Aantal bladluizen dat met de bladluizenfinken te Dirkshorn en Aarstwoud gedurende week 13 t/m week 23 gevangen is. De mate van grijs/zwart arcering correleert met het aantal gevangen bladluizen. Tevens zijn relevantie meteogegevens voor de vangstdagen in de tabel opgenomen (minimum-, maximum- en gemiddelde temperatuur in Noord-Holland, neerslag en gemiddelde windsnelheid). De mate van blauw- en roodarcering komt overeen met de relatieve kou of warmte op desbetreffende dag.

datum	Aantal bladluizen		Temperatuur (°C)			Neerslag (mm)	Gemiddelde Windsnelheid (m/s)
	A. Dirkshorn	B. Aarstwoud	T_Min	T_max	T_Gemiddeld		
27-mrt-12	0	0	1.8	15.4	8.0	0.0	1.6
28-mrt-12	0	0	2.1	19.1	9.0	8.8	1.5
3-apr-12	0	0	0.6	16.3	7.6	0.0	0.6
4-apr-12	0	0	3.6	8.1	5.5	0.0	3.9
11-apr-12	0	0	3.0	14.7	8.4	0.0	1.4
12-apr-12	0	0	-0.9	13.6	7.6	0.0	1.2
17-apr-12	0	0	-3.1	9.9	3.0	2.4	5.7
18-apr-12	0	0	3.5	12.5	5.3	2.0	5.5
19-apr-12	0	0	4.2	11.7	6.1	0.6	5.5
20-apr-12	0	0	2.5	11.3	6.3	0.0	5.0
24-apr-12	0	0	6.3	12.9	8.4	8.6	2.1
25-apr-12	0	0	6.7	12.9	8.8	1.4	3.7
26-apr-12	1	0	7.7	14.8	9.6	0.0	4.8
2-mei-12	0	0	9.0	19.4	13.0	0.0	3.5
3-mei-12	0	1	8.7	12.8	11.8	3.0	2.8
4-mei-12	0	0	6.7	11.0	10.9	0.4	2.9
8-mei-12	0	0	8.3	17.8	11.7	8.0	3.6
9-mei-12	3	5	11.2	16.8	12.7	0.2	3.5
15-mei-12	0	0	6.4	13.0	9.3	8.8	3.8
16-mei-12	0	3	5.1	13.6	8.9	2.2	5.1
22-mei-12	13	41	12.8	24.8	17.9	0.0	4.8
23-mei-12	15	48	15.1	25.4	20.0	1.2	3.8
24-mei-12	145	220	15.3	27.3	20.8	0.2	3.7
25-mei-12	76	317	13.7	26.0	19.1	0.0	4.3
30-mei-12	4	14	6.2	24.7	13.4	0.2	1.5
31-mei-12	22	58	11.5	15.1	13.2	9.0	2.4
1-jun-12	9	1	9.0	17.2	12.4	0.0	2.8
5-jun-12	2	1	6.1	17.2	11.7	0.0	2.3
totaal	290	709					

4 Analyse aanwezigheid TBV in gevangen bladluizen

4.1 Toetsontwikkeling

Detectie van TBV in tulpen en lelies gebeurt doorgaans met ELISA. Reguliere PCR-toetsen voor TBV waren vanuit het verleden beschikbaar, maar zijn mogelijk niet gevoelig genoeg voor PCR-detectie van TBV in bladluizen. Een TaqMAN PCR toets is gevoeliger dan een reguliere PCR. Daarom is als eerste gestart met de ontwikkeling van de TaqMAN PCR-toets voor TBV. Hierbij werd rekening gehouden met het feit dat tulp met zowel TBV als LMoV geïnfecteerd kan zijn. TBV en LMoV zijn genetisch nauw verwant aan elkaar.

Met behulp van sequentie-alignments van beschikbare TBV en LMoV isolaten zijn diverse primers en probes ontwikkeld (Tabel 2) die vervolgens met behulp van een collectie TBV en LMoV-isolaten uit tulp op PCR-eigenschappen getest zijn (Tabel 3 en Tabel 4). Op basis van diverse prestatiekenmerken van de verschillende primer/probe combinaties is er een primer/probeset voor TBV geselecteerd, en een primer/probe-set voor LMoV (Tabel 2).

Tabel 2. Primers en probes ontwikkeld voor ontwikkeling TaqMAN PCR-toets voor TBV en LMoV. De primers/probe voor de uiteindelijke TBV-toets zijn groen gearceerd. De primers/probe voor de uiteindelijke LMoV-toets zijn blauw gearceerd.

Pimers	Sequentie (5'- 3')
TBVTaqF7	ACA AGG AGA GGA CAC GGA GA
TBVTaqF9	GTC GGA ACA CAA GGA GAG GA
TBVTaqR9	GGG TCT TTC AAA CCG AGA CA
TBVTaqF1	TGG AAT GTG GGT TAT GAT GG
TBVTaqR1	GCC TCA GCT AGC GAT GAA AA
LMoVTaqF1	CGA AGG AAG CAC ACT TCC AGA TG
LMoVTaqF2	CGA AGG AAG CAC ACT TCC A
LMoVTaqR1	GTA TGC CTC TCC GTG TCC TC
Probes	Sequentie (5'- 3')
TBVPr	TAG GAA CAT GCA CAC CCT CA
LMoVPr	GCG GAA AAC AAT CGA AGC TA

Tabel 3. Ct-waarden van SyberGreen PCR toetsen met twee primercombinaties (F7R9 en F9R9) op diverse TBV en LMoV-isolaten uit tulp. Virusisolaten zijn afkomstig uit tulpen met visuele symptomen van TBV-besmetting. Op basis van RFLP-analyse is voor 6 monsters bepaald of er sprake was van een TBV- of LMoV-besmetting.

Monster	Virus isolaat op basis van RFLP analyse	Ct (dR) waarde TBV PCR (SyberGreen)		Ct (dR) waarde LMoV PCR (SyberGreen)	
		F7R9	F9R9	F1R1	F2R1
1	TBV	14.00	14.14	22.76	25.27
2	TBV	18.77	18.89	25.21	26.21
3	TBV	14.92	14.75	25.64	No Ct
4	TBV	10.47	10.31	27.08	30.3
5	LMoV	23.59	24.03	14.64	15.17
6	LMoV	23.97	24.41	13.80	13.73
7	Water	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

Tabel 4. Ct-waarden van TaqMAN PCR toetsen met twee primercombinaties (F7R9 en F9R9) en bijbehorende TBV-probe (TBVPr) en LMoV-probe (LMoVPr) op diverse TBV en LMoV-isolaten uit tulp. Virusisolaten zijn afkomstig uit tulpen met visuele symptomen van TBV-besmetting. Op basis van RFLP-analyse is voor 6 monsters bepaald of er sprake was van een TBV- of LMoV-besmetting.

Monster	Virus isolaat op basis van RFLP analyse	Ct (dR) waarde TBV PCR (SyberGreen)		Ct (dR) waarde LMoV PCR (SyberGreen)	
		F7R9	F9R9	F1R1	F2R1
1	TBV	19.00	17.00	29.98	29.22
2	TBV	23.94	21.54	30.2	No Ct
3	TBV	16.95	17.32	31.03	29.85
4	TBV	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested
5	LMoV	28.72	27.92	18.71	17.91
6	LMoV	28.60	28.05	17.65	16.57
7	Water	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

4.2 Analyse bladluizenvangst 2011 op aanwezigheid PVY – *proof of concept*

4.2.1 Achtergrond

Van der Vlucht en collega's hebben in 2012 een onderzoek gepubliceerd waarin bladluizenvluchten tijdens het aardappelteeltseizoen in Lelystad en Wageningen zijn onderzocht op aanwezigheid van Aardappelvirus Y (PVY). PVY is net als TBV een potyvirus, beide virussen zijn nauw verwant aan elkaar en worden beide door bladluizen verspreid. In dit onderzoek zijn bladluizen met vangbakken en bladluizen fuiken gevangen. Van 230 individuele bladluizen is een RNA-extract gemaakt welke vervolgens met PCR-diagnostiek zijn onderzocht op aanwezigheid van PVY. Wanneer de gevangen bladluizen als grote groep worden beschouwd (dus niet op soortniveau), dan werd in 24% van de gevangen bladluizen met PCR-diagnostiek PVY aangetroffen. Dit onderzoek heeft dus laten zien dat in afwezigheid van PVY-besmette aardappelteelt er weldegelijk PVY-besmette bladluizenvluchten aanwezig zijn.

Omdat met name in de Flevopolder ook grootschalige tulpen teelt plaats vindt, kan de populatie bladluizen uit het PVY-onderzoek 'hergebruikt' worden voor aanvullend onderzoek naar aanwezigheid van TBV in dit gebied. Voordat de RNA-extracten van de individuele bladluizen opnieuw gebruikt zijn voor PCR-diagnostiek voor TBV, is onderzocht of PVY-besmetting in specifieke monsters herbevestigd kon worden. Bij herbevestiging van een positief PCR-resultaat wordt aangetoond dat het RNA extract na 1 jaar bewaring in de -80°C vriezer nog steeds te gebruiken is. Mocht herbevestiging van aanwezigheid van PVY in specifieke bladluismonsters niet mogelijk zijn, dan is dit een sterke aanwijzing dat het RNA-extract dermate in kwaliteit achteruit is gegaan, dat heranalyse met TBV-diagnostiek niet informatief is.

4.2.2 Werkwijze en resultaten

Een selectie van individuele bladluizen welke in 2011 positief getoetst zijn voor PVY zijn in 2012 opnieuw volgens de methode beschreven in Van der Vlucht et al (2012) getoetst op aanwezigheid van PVY (Tabel 5). Een aantal van de samples die in 2011 positief getoetst zijn, werden in 2012 opnieuw positief getoetst (nr. 101, 126, 145). Er zijn ook een aantal samples die in 2011 positief getoetst zijn, maar bij heranalyse twee maal een negatief resultaat opleverde (67, 75, 80 en 86). Daarnaast zijn er verrassend ook een aantal samples waarbij in 2011 een negatief toetsresultaat werd verkregen, maar in heranalyse in 2012 een positief toetsresultaat werd verkregen.

Doorgaans wordt een Ct-waarde <33 als positief resultaat beoordeeld, Ct-waarden tussen 33 en 37 betreffen zeer lage virusconcentraties. Een Ct-waarde >38 is doorgaans een negatief resultaat.

Omdat er bij deze PVY-analyses toch een amplificatiecurve werd waargenomen zijn amplicons met gelelectroforese onderzocht. In alle gevallen dat een Ct-waarde tot 45 werd waargenomen, werd ook een amplicon van gewenste grootte met gelelectroforese waargenomen (resultaten zijn niet getoond). Met deze analyses is aangetoond dat de RNA-extracten uit 2011 nog van voldoende kwaliteit zijn voor detectie van PVY en daarmee waarschijnlijk ook voor detectie van TBV. De reproduceerbaarheid t.o.v. 2011 is echter laag. Mogelijk dat de concentratie PVY in een bladluis net op de kritische grens zit van wat nog net wel of net niet met TaqMAN PCR aantoonbaar is.

Tabel 5. Resultaten 1^{ste} PCR-detectie van PVY op selectie van bladluizen (nr, omschrijving) in 2011 en bij heramplificatie in 2012. Bladluizenvangsten en bijbehorende RNA-extracten zijn afkomstig van Van der Vlucht et al (2012). In 2012 zijn samples in duplo geanalyseerd, beide toetsresultaten zijn in tabel weergegeven. Neg: negatief PCR-resultaat. Wanneer een Ct-waarde verkregen werd, dan is dit getal in de tabel genoemd. Groen: negatief PCR-resultaat, rood: positief PCR-resultaat (Ct < 45), oranje: twijfel resultaat (Ct 45-50).

nr.	Omschrijving	PVY-detectie (2011)	PVY-detectie (2012)
65	LS R. padi, 31-5V1	neg	38/44
66	LS R. padi, 3-6V1	neg	40/40
67	LS P. humuli, 14-6V1	38	neg
71	LS A. nasturtii/frangulae 3, 28-6V1	neg	neg
75	LS M. persicae 1, 28-6V1	38.96	neg
77	LS M. persicae 3, 28-6V1	neg	neg
80	LS M. persicae 1, 28-6V2	41.25	neg
83	LS R. padi 1, 1-7V2	neg	neg
86	LS R. padi 1, 26-4 F1	37.41	neg
94	LS R. padi 3, 6-5 F1	neg	40/neg
101	LS R. padi 1, 24-5 F1	33.47	39/39
126	LS R. padi 4, 7-6 F1	35.96	neg/42
145	LS A. pisum 1, 21-6 F1	42.98	42/36
150	LS A. nasturtii/frangulae 1, 21-6 F1	46.97	43/41
164	LS A. nasturtii/frangulae 4, 28-6 F2	neg	37/40
165	LS M. persicae 1, 28-6 F2	neg	42/43

4.3 Analyse bladluizenvangst 2011 op aanwezigheid PVY

4.3.1 Werkwijze en resultaten

Een selectie 48 RNA extracten van bladluizen uit het onderzoek van Van der Vlucht et al (2012) is onderzocht met de in dit project ontwikkelde TaqMAN PCR toets voor TBV (§4.1). Alle bladluizen waren gevangen in Lelystad. Van deze 48 extracten is in 2011 bij 41 RNA-extracten de aanwezigheid van PVY bevestigd (Van der Vlucht et al (2012)). Deze selectie van bladluizen is daarom eerder in verband gebracht met hun potentiële rol als vector van potyvirusen zoals PVY.

Ondanks diverse technische variaties in de PCR-reactie heeft geen van de 48 RNA extracten tot een positief PCR-resultaat voor TBV geleid. TBV is daarom niet aangetoond in deze selectie van bladluizen gevangen in Lelystad. Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor bladluisvluchten die TBV bij zich hadden.

4.4 Analyse bladluizen 2012 op aanwezigheid TBV

4.4.1 Werkwijze

In de periode 27 maart t/m 5 juni 2012 zijn in Dirkshorn 290 bladluizen gevangen, in Aartswoud 709 bladluizen. Aanwezigheid van TBV in/op deze bladluizen is met de bijbehorende Taqman-toets bestudeerd. Bij her-analyse van individuele bladluisextracten op aanwezigheid van PVY, is geconstateerd dat de concentratie PVY in één bladluis mogelijk dermate laag is, dat PCR-detectie net wel of net niet succesvol is (§4.2.2).

Om dit te ondervangen zijn bij de analyse van bladluizen gevangen in Dirkshorn en Aarstwoud pools (porties) van bladluizen gemaakt. Bij aanwezigheid van meerdere bladluizen met TBV per mengmonsters, wordt de detectiekans groter. Daarentegen wordt niet verwacht dat de detectiekans van 1 TBV-besmette bladluis in een pool van bladluizen lager is dan bij analyse van enkelvoudige bladluizen. De capaciteit van de RNA-extractie procedure is namelijk voldoende voor RNA-extractie van pools van bladluizen.

Voorafgaand aan RNA-extractie met de RNeasy Mini Kit (Qiagen) zijn bladluizen van individuele vangstdata daarom in porties van 5, 10 en 25 bladluizen samengevoegd (Tabel 6). cDNA synthese en TaqMAN PCRs zijn uitgevoerd volgens de instructies behorende bij de reagentia. Naast virusdetectie met de TaqMAN PCR zijn alle RNA-extracten ook getest met een reguliere PCR-toets.

4.4.2 Resultaten

Diverse technische variaties in de PCR-reactie zijn toegepast om maximale informatie uit de collectie bladluizen te verkrijgen. Kort samengevat heeft slechts één van alle uitvoerde (TaqMAN) PCR reacties op de pools met bladluizen geresulteerd in een amplificatiecurve met nog steeds een hoge Ct waarde (Figuur 1). Dit betrof RNA-sample 18 (locatie Aarstwoud, vangstdatum 25 mei 2012). Doorgaans wordt een Ct-waarde <33 als positief resultaat beoordeeld, Ct-waarden tussen 33 en 37 betreffen zeer lage virusconcentraties. Een Ct-waarde >38 is doorgaans een negatief resultaat. Omdat er toch een amplificatiecurve werd waargenomen zijn diverse heranalyses uitgevoerd. Bij heranalyse met dezelfde toetsmethode werd soms wel een amplificatiecurve met hoge Ct waargenomen (Ct = 38-42), maar soms bleef ook elke vorm van amplificatie afwezig. In het geval dat een amplificatie met de TaqMAN PCR optrad, is het PCR-product nog met een agarose-gel onderzocht. Een PCR-product van gewenste lengte is in geen van deze gevallen waargenomen.

Deze wisselende resultaten trekt de aanwezigheid van TBV in dit monster in twijfel. Met reguliere TBV-PCR kon in RNA-sample 18 ook geen TBV worden aangetoond.

Ondanks uitgebreide analyses met verschillende PCR-technieken is er geen TBV in de gevangen bladluizen waargenomen. Er zijn in dit onderzoek in Dirkshorn en Aarstwoud geen aanwijzingen gevonden voor bladluisvluchten die TBV bij zich hadden.

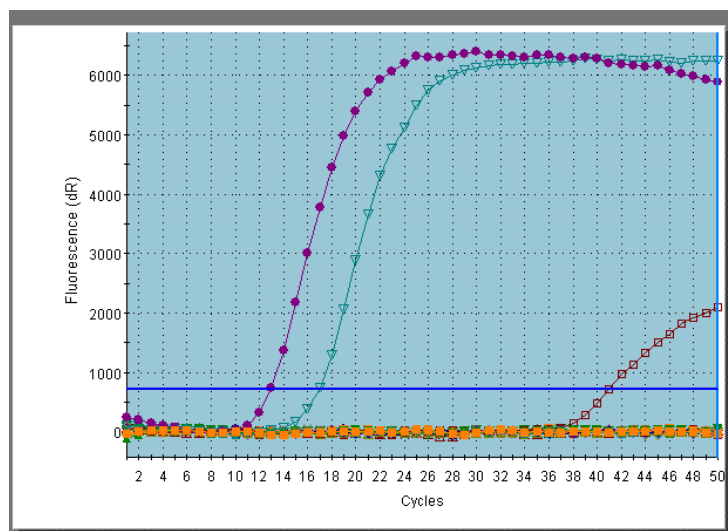
4.5 Conclusies

Tientallen bladluizen gevangen in de omgeving van Lelystad, 290 bladluizen gevangen in Dirkshorn en ruim 700 bladluizen gevangen in Aarstwoud, zijn met PCR-diagnostiek onderzocht op aanwezigheid van TBV. Met behulp van de toegepaste onderzoeksmethoden zijn er geen aanwijzingen gevonden dat gevangen bladluizen TBV bij zich hadden. Voor de tulpensector is dit een hoopgevend resultaat.

Tabel 6. Overzicht van RNA-extracties verkregen van pools van bladluizen afkomstig van verschillende locaties (A: Dirkshorn, B: Aartswoud).

RNA#	lokatie	vangstdatum	# luizen
1	A	25-5-2012	5
2	A	25-5-2012	5
3	A	25-5-2012	5
4	A	25-5-2012	5
5	A	25-5-2012	5
6	A	25-5-2012	10
7	A	25-5-2012	10
8	A	25-5-2012	10
9	A	25-5-2012	10
10	A	25-5-2012	25
11	B	25-5-2012	5
12	B	25-5-2012	5
13	B	25-5-2012	5
14	B	25-5-2012	5
15	B	25-5-2012	5
16	B	25-5-2012	10
17	B	25-5-2012	10
18	B	25-5-2012	10
19	B	25-5-2012	10
20	B	25-5-2012	25
21	A	05-6-12 + 01-6-2012	2+9
22	A	31-5-2012	23
23	A	30-5-2012	5
24	A	25-5-2012	21
25	A	25-5-2012	21
26	A	24-5-2012	20
27	A	24-5-2012	20
28	A	24-5-2012	20
29	A	24-5-2012	20
30	A	24-5-2012	20
31	B	1-6-12 + 31-5-12	1+19
32	B	31-5-2012	20
33	B	31-5-2012	19

RNA#	lokatie	vangstdatum	# luizen
34	B	30-5-2012	14
35	B	25-5-2012	20
36	B	25-5-2012	20
37	B	25-5-2012	20
38	B	25-5-2012	20
39	B	25-5-2012	20
40	B	25-5-2012	20
41	A	24-5-2012	22
42	A	24-5-2012	22
43	A	23-5-2012	15
44	A	22-5-2012	13
45	A	9-5-2012 + 26-4-2012	3+1
46	B	25-5-2012	21
47	B	25-5-2012	21
48	B	25-5-2012	21
49	B	25-5-2012	21
50	B	25-5-2012	21
51	B	24-5-2012	20
52	B	24-5-2012	20
53	B	24-5-2012	20
54	B	24-5-2012	20
55	B	24-5-2012	20
56	B	24-5-2012	20
57	B	24-5-2012	20
58	B	24-5-2012	20
59	B	24-5-2012	20
60	B	24-5-2012	20
61	B	24-5-2012	20
62	B	23-5-2012	24
63	B	23-5-2012	24
64	B	22-5-2012	20
65	B	22-5-2012	21
66	B	15-05-2012 + 9-5-2012 + 3-5-2012	3+5+1



Figuur 3. Amplificatie-curves van TaqMAN PCR voor TBV. Twee positieve controles geven een efficiënte amplificatie met Ct-waarden van 16.95 en 12.98 (paarse en blauwe lijn). RNA-sample #18 laat in deze PCR-reactie een zeer late amplificatie zien met een Ct-waarde van 41.00 (bruine lijn). Bij de overige samples vindt geen amplificatie plaats waardoor de lijn horizontaal blijft lopen.

5 Analyse onkruid op aanwezigheid van TBV

5.1 Werkwijze en resultaten

Onkruidmonsters zijn verzameld op negen locaties (zie ook Figuur 1). Deze locaties zijn in het verleden vanuit praktijkervaringen in verband gebracht met onverwachte toename aan TBV.

1. Perceel aan de spoordijk langs de N241 bij Dirkshorn/Blokhuizen (locatie bladluisfuk 1)
2. Perceel aan de Koningskade nabij Hoogwout (onverklaarbare TVX-infectie op dit perceel in 2011)
3. Perceel aan de Zuiderzeestraat bij Aarstwoud (locatie bladluisfuk 2)
4. Perceel aan de Baarsdorpermeer, nabij Zuidermeer
5. Perceel aan de Veldhuizerweg nabij Berkhout
6. Perceel aan de Neushoornweg, nabij Ens
7. Perceel aan de N451 tussen Emmeloord en Luttelgeest
8. Perceel aan de Kokkelweg nabij Biddinghuizen
9. Perceel aan de Mosselweg nabij Biddinghuizen

In totaal zijn van deze negen locaties 414 verschillende onkruidmonsters behorend tot 44 verschillende soorten met ELISA onderzocht op aanwezigheid van potyvirusen, de virusgroep waartoe TBV behoort (Tabel 7). ELISA is uitgevoerd volgens de bijbehorende instructies van Agdia. Een ELISA-waarde werd als positief beoordeeld wanneer de extinctie-waarde boven de 0.10 uitkomt. Bij 27 monsters werd met ELISA een positief toetsresultaat verkregen. Opvallend was dat bij de meeste onkruidmonsters een zwak-positief ELISA-resultaat verkregen werd, tussen de 0.11 en 0.35. Drie van de 5 monsters zevenblad resulteerden in een ELISA-resultaat van 0.5. De positieve controle (TBV) leverde in deze ELISA's een waarde op boven de 1.0. De ELISA gericht op potyvirusen heeft daarom geen duidelijke aanwijzingen gegeven voor aanwezigheid van TBV.

Aanwezigheid van TBV is in de 27 onkruidmonsters met een ELISA-waarde >0.1 aansluitend met de TaqMAN PCR voor TBV onderzocht. Een TaqMAN toets is gevoeliger en specifiekere dan ELISA. Voorafgaand aan PCR-diagnostiek werd RNA-extractie uitgevoerd met de Qiagen RNeasy Mini Kit. Bij geen van de 27 onkruidmonsters is TBV gedetecteerd. De zwak-positieve ELISA-resultaten werden daarom niet veroorzaakt door TBV. Het is onduidelijk of het zwak-positieve ELISA-resultaat door een ander potyvirus werd veroorzaakt, of dat dit een technisch artefact is vanwege ELISA op onbekend plantmateriaal (onkruid).

5.2 Conclusies en aanbevelingen

Analyse op aanwezigheid van TBV in onkruiden op percelen die in het verleden in verband zijn gebracht met onverwachte toename aan TBV heeft niet geresulteerd in de identificatie van TBV-geïnfecteerde onkruiden. Volgens deze analyse zijn de onderzochte onkruiden vooralsnog geen bron voor TBV. Bij dit resultaat zijn een aantal opmerkingen te plaatsen:

- Er is slechts een zeer kleine steekproef aan onkruiden bemonsterd en de analyse betreft zowel zaadonkruiden als meerjarige wortelonkruiden. Het is ondoenlijk om alle onkruiden op een perceel te bemonsteren.
- Potyvirusen kunnen doorgaans niet via zaad verspreiden. De aanwezigheid van TBV in onkruiden wordt daarom eerder bij meerjarige onkruiden verwacht dan bij éénjarige onkruiden.
- Mocht een onkruidsoort een reservoir kunnen zijn voor TBV (of een ander virus), dan is onbekend wat het infectiepercentage bij dergelijk onkruidsoort is.

Tabel 7. Overzicht van onkruid- en gewasmonsters die gebruikt zijn voor onderzoek naar aanwezigheid van TBV in waardplanten anders dan tulp. Aanwezigheid van potyvirusen is eerst voor alle monsters met een ELISA (Agdia) onderzocht. De aanwezigheid van TBV in ELISA-positieve samples is aansluitend met TaqMAN PCR-toets voor TBV gecontroleerd.

Soort	Aantal monsters	Aantal TBV-positief	
		(ELISA)	(PCR)
akkerdistel	14	1	0
akkermelkdistel	18		
bereklauw	10	2	0
blad els + luis	7		
brandnetel	24	1	0
fluitekruid	20	2	0
gekroesde melkdistel	11		
gras	13	2	0
grote ereprijs	2		
grote weegbree	8	4	0
herderstasje	8		
hondsdrif	4		
iep, vergeling in top	1		
klaver	6		
kleefkruid	4		
klein hoefblad	1	1	0
klein kruiskruid	2		
kleine veldkers	8		
kleine zuring	2	1	0
klimopereprijs	1		
kruijpende boterbloem	12		
kruiskruid	2		

Soort	Aantal monsters	Aantal TBV-positief	
		(ELISA)	(PCR)
linde	0		
madelief	0	1	0
melkdistel	0		
melkdistel	0		
nachtschade	0		
onbekend	0	4	0
ooiervaarsbek	0		
paardebloem	0		
pinksterbloem	0		
ridderzuring	0	1	0
smalle weegbree	0		
speenkruid	0		
speerdistel	0		
tuinwolfsmelk	0		
veenwortel	0	3	0
vogelmuur	0	1	0
vogelwikke	0		
witte klaver	0		
witte melde	0		
witte populier	0		
zeegroene ganzevoet	0		
zevenblad	0	5	0

6 Algemene conclusies en aanbevelingen

In dit project is onderzoek gedaan naar aanwezigheid van TBV in bladluizenvluchten en onkruiden welke verzameld zijn in teeltregio's van tulp waar in het verleden aanwijzingen/suggesties waren voor onverklaarbare toename van TBV in partijen tulp. In dit project zijn in 2012 op twee locaties gedetailleerde bladluizenvangsten uitgevoerd en op 9 locaties zijn onkruidmonsters verzameld. Daarnaast is een collectie bladluizen gevangen in 2011 in de omgeving van Lelystad voor dit onderzoek gebruikt. De gevangen bladluizen en de onkruidmonsters zijn onderzocht op aanwezigheid van TBV. Dit project heeft tot de volgende conclusies geleid:

- Pas bij de echte temperatuurstijging in de tweede helft van mei (vanaf een gemiddelde dagtemperatuur boven de 17°C) is een grote bladluizenvlucht op gang gekomen. Per dag werden er met één fuik tientallen tot zelfs een paar honderd bladluizen gevangen.
- Er is aangetoond dat dat er grote verschillen in omvang van bladluizenvluchten kunnen zijn. Stel dat op beide locaties een vergelijkbare partij met 1% TBV werd geteeld, dan was het risico op virusverspreiding door bladluizen vanwege verschil in aantallen bladluizen op locatie B 2,5x zo groot als op locatie A.
- Er is een TaqMAN PCR-toets voor TBV en LMoV ontwikkeld.
- Er is geen TBV aangetoond in bladluizen die in 2011 in de omgeving van Lelystad gevangen zijn.
- Er is geen TBV aangetoond in bladluizen die in 2012 in de omgeving van Dirksborn gevangen zijn.
- Er is geen TBV aangetoond in bladluizen die in 2012 in de omgeving van Aartswoud gevangen zijn.
- Tientallen bladluizen gevangen in de omgeving van Lelystad, 290 bladluizen gevangen in Dirksborn en ruim 700 bladluizen gevangen in Aartswoud zijn met PCR-diagnostiek onderzocht op aanwezigheid van TBV. Met behulp van de toegepaste onderzoeksmethoden zijn er geen aanwijzingen gevonden dat gevangen bladluizen TBV bij zich hadden. Voor de tulpensector is dit een hoopgevend resultaat.
- Analyse op aanwezigheid van TBV in onkruiden op percelen die in het verleden in verband zijn gebracht met onverwachte toename aan TBV heeft niet geresulteerd in de identificatie van TBV-geïnfecteerde onkruiden.

Aanbevelingen:

- In dit onderzoek zijn bladluizenvluchten op aanwezigheid van virus geanalyseerd terwijl er in de naaste omgeving geen virusgeïnfecteerde tulpenteelt plaats vond. Mocht onderzoek naar virusvluchten bij bladluizen in nieuw onderzoek opnieuw aandacht krijgen, dan wordt geadviseerd om in ieder geval ook bladluizen in een virusgeïnfecteerd tulpenveld te vangen en te analyseren.
- Mocht onderzoek naar TBV-reservoirs, of reservoirs voor andere virussen die door bladluizen verspreid worden, in de toekomst opnieuw onderzocht worden, dan wordt op basis van de ervaringen uit dit onderzoek geadviseerd om gerichte proefvelden aan te leggen met virus-besmette tulpen en de onkruidgroei nabij dit proefveld de vrije gang te laten gaan. Er wordt geadviseerd om deze proefvelden op diverse teeltlocaties in Nederland neer te leggen om hiermee de variatie in regionale onkruidsoorten te ondervangen. Als alternatief kan in een dergelijke proefopzet nabij de virus-besmette tulpen specifieke onkruidsoorten aangeplant/gezaaid worden. Aansluitend op de tulpenteelt kan het onkruid met ELISA en/of PCR worden geanalyseerd.

7 Geraadpleegde literatuur

- Kock, M.J.D. de; Lemmers, M.E.C.; Dalen-Sanders, L. van; Pham, K.T.K.; Stijger, I. (2009a) Non-persistente virusoverdracht door bladluizen in bloembollen. BO-06-005 Plantgezondheid, thema Fytopanitaire Beta - Project 3.1.7
- Kock, M.J.D. de; Stijger, I.; Lemmers, M.E.C.; Pham, K.T.K.; Dam, M.F.N. van (2009b) TBV-verspreiding door bladluizen. Productschap Tuinbouw
- Van der Vlugt, R., Van Bekkum, P., Van Raaij, H., Piron, P., Verbeek, M., Topper, C. Bus, K., Wustman, R. (2012) Bronnen van Aardappelvirus Y. Productschap Akkerbouw.