

Toetsontwikkeling PSTVd in Dahlia

P.J. van Leeuwen, J.P.T. Trompert, M.E.C. Lemmers, M. Verbeek¹, E.T.M. Meekes²

1 Wageningen UR, PRI Biointeracties en Plantgezondheid

2 Naktuinbouw



Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en
Fruit
April 2016

PPO nr. 37 361822 00

© 2016 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 en Fruit

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

Projectnummer: 37 361822 00
PT nr. 15061

De bloemen- en plantensector investeert in dit project via het  Productschap **Tuinbouw**

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

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel. : +31 252 462100
Fax : +31 252 462100
E-mail : info.bollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 PROEFOPZET	9
2.1 Aanloop naar het onderzoek	9
2.2 1 ^e infectieproef, maart 2015	9
2.3 2 ^e infectieproef, juni 2015.....	11
2.4 3 ^e infectieproef, oktober 2015.....	11
2.5 Optimalisatie RNA extractie uit plantmateriaal van Dahlia en toetsing op aanwezigheid van het PSTVd 12	
3 RESULTATEN	15
3.1 1 ^e infectieproef (maart 2015).....	15
3.1.1 Visuele waarnemingen.....	15
3.1.2 Toetsingsresultaten	15
3.2 2 ^e infectieproef (juni 2015)	18
3.2.1 Visuele waarnemingen.....	18
3.2.2 Toetsresultaten	18
3.3 3 ^e infectieproef (oktober 2015).....	19
3.3.1 Visuele waarnemingen.....	19
3.3.2 Toetsresultaten	19
3.4 Resultaten optimalisatie extractie methodes en verschillende toetsen	20
4 DISCUSSIE EN CONCLUSIES	23

Samenvatting

Potato spindle tuber viroid = aardappelspindelknolviroïde (PSTVd) is een quarantaine viroïde dat veel schade veroorzaakt in aardappel en tomaat. Het viroïde is in 2013 voor het eerst in Nederland in Dahlia aangetroffen. Omdat er vrijwel niets bekend is over de aantoonbaarheid en het gedrag van dit viroïde in Dahlia is in 2015 onderzoek hiernaar gestart. Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw (2014-2015) en wordt via een Publiek Private Samenwerking (PPS) binnen de topsector T&U voorgezet in 2016-2017. Dit verslag betreft het onderzoek in 2014-2015.

Er zijn verschillende extractie- en toetsmethoden getest om vast te stellen of de aantoonbaarheid verbeterd kan worden. De standaard door Naktuinbouw gehanteerde extractie- en toetsmethode bleek goed te voldoen. Onder de proefomstandigheden in de kas was PSTVd in besmette Dahliaplanten vanaf 8 weken na besmetting van mei t/m november goed aantoonbaar. Bij de vondst op het veld in 2013 was PSTVd in september slecht aantoonbaar. Mogelijk is de temperatuur van invloed op de aantoonbaarheid. Het viroïde was zowel in de wortels, het blad als de bloembladeren aantoonbaar. Of de verdeling altijd homogeen over de plant verdeeld is, is nog niet bekend. Dahliaplanten konden goed met infectieus sap worden besmet met PSTVd. Er was daarbij geen verschil in gevoeligheid tussen jongere en oudere planten en tussen de gebruikte cultivars. Infectie van planten in maart leek beter te lukken dan infectie in juni of oktober. De omstandigheden zijn blijikbaar van invloed op de vatbaarheid of overdracht.

1 Inleiding

Potato spindle tuber viroid = aardappelspindelknolviroïde (PSTVd) is een quarantaine viroïde dat veel schade veroorzaakt in aardappel en tomaat. Het viroïde is in 2010 in Japan in Dahlia aangetroffen en de verplichting van Japan om Nederlandse Dahlia te toetsen op PSTVd voor export heeft er toe geleid dat in 2013 dit viroïde ook in Nederland in Dahlia is aangetroffen. Dit betrof zeven cultivars bij één teler. Bij andere telers waarmee vanuit dit bedrijf plantmateriaal is uitgewisseld is geen PSTVd aangetroffen. Omdat het een quarantaine-organisme betreft, zijn de besmette partijen vernietigd wat verstreckende gevolgen heeft gehad voor het getroffen bedrijf.

In 2014 is door PPO met financiering vanuit het Productschap Tuinbouw een deskstudie uitgevoerd om vast te stellen wat bekend is over PSTVd zoals waardplanten, schade en symptomen, de methodes van verspreiding en variaties in PSTVd. Uit deze deskstudie bleek dat er weinig bekend is over PSTVd in Dahlia en veel vragen open blijven.

Naar aanleiding van de deskstudie is door de dahliakwekers besloten dat er meer kennis nodig is over PSTVd in Dahlia om het probleem beheersbaar te houden.

In 2014 heeft de NWWA een survey uitgevoerd om vast te stellen of PSTVd vaker voorkomt in Nederlandse Dahlia's en of met de vernietiging van het plantmateriaal PSTVd niet meer voorkomt in Dahlia in Nederland. Er is voor gekozen om van alle partijen van de zeven cultivars waarin het viroïde in 2013 is aangetroffen een monster te nemen en te velde te planten om in de zomer met behulp van een toets te onderzoeken op de aanwezigheid van PSTVd. Uit dit onderzoek bleek dat het viroïde in geen van de monsters kon worden aangetoond.

Dit verslag omvat het onderzoek dat is gestart in 2014 en voorgezet in 2015, gefinancierd door het Productschap Tuinbouw. Tijdens dit onderzoek is via een Publiek Private Samenwerking (PPS) binnen de topsector T&U uitbreiding van het onderzoekbudget verkregen via het Ministerie van EZ waardoor het onderzoek in 2016 en gedeelte van 2017 kan worden voortgezet.

Voor het onderzoek door PT gefinancierd zijn vier doelstelling geformuleerd:

- Toetsontwikkeling PSTVd in Dahlia. Optimalisatie van de extractiemethode waardoor lage concentraties viroïde eerder aantoonbaar zijn en hierdoor jong plantmateriaal al geschikt is voor toetsing.
- Vaststellen op welke momenten gedurende het teeltseizoen PSTVd-besmetting in Dahlia via een toets aantoonbaar is.
- Onderzoeken of de aantoonbaarheid in plantmateriaal (stekken) te vergroten is door de temperatuur, hoeveelheid licht of daglengte aan te passen.
- Ten slotte enkele basale feiten vaststellen zoals: concentratie viroïde in een besmette plant gedurende de loop van het seizoen en gevoeligheid voor besmetting van Dahlia voor PSTVd; is Dahlia gemakkelijk via besmet sap te infecteren en op welke momenten in het seizoen?

2 Proefopzet

2.1 Aanloop naar het onderzoek

Bij aanvang van het onderzoek in de tweede helft van 2014 bleek dat er geen PSTVd-besmet plantmateriaal van Dahlia beschikbaar was. Het materiaal dat de NWWA ter beschikking had was verloren gegaan of PSTVd was in dat materiaal niet meer aantoonbaar. Daarop is besloten om zelf planten te besmetten waarmee direct ook één van de vragen uit het onderzoek zou worden beantwoord.

Er is gekozen voor vier cultivars uit de NWWA survey. Van deze cultivars was immers bekend dat ze besmet kunnen zijn met PSTVd. Nadat de planten uit de survey waren getoetst en vrij bevonden van PSTVd is een aantal planten van het veld gesnoeid, gerooid (september 2014) en in de kas opgepot. De gesnoeide planten gingen zijscheuten maken. In november 2014 en januari 2015 zijn daarvan stekken geplukt die gebruikt zijn voor het onderzoek. Dit waren stekken van planten (zij scheuten van moederplanten) en geen stekken van knollen zoals gebruikelijk bij de stekproductie voor knollen.

Bij de NWWA zijn ten behoeve van dit onderzoek tomatenplanten besmet met een PSTVd-isolaat afkomstig uit Dahlia. Het sap van deze planten is gebruikt voor drie infectieproeven die gedurende 2015 zijn uitgevoerd. Daarnaast is gewerkt aan het optimaliseren van de extractie en het vergelijken van toetsmethoden.

2.2 1^e infectieproef, maart 2015

In de eerste infectieproef is onderzocht:

1. Of er een verschil in vatbaarheid is tussen cultivars (Garden Wonder, Thomas Edison, Mystery Day, Kelvin Floodlight)
2. Of er een verschil in vatbaarheid is tussen oude en jonge stekken/planten van respectievelijk vier en twee maanden oud (november 2014, januari 2015).
3. Of er een verschil is tussen inoculatiemethoden (besmet sap inwrijven met carborundumpoeder, snijden met besmet mes, injecteren van besmet sap in de plant).

Per behandeling zijn vier planten (herhalingen) gebruikt. Totaal bestaat de proef uit 96 planten. Het besmetten van de planten heeft plaatsgevonden op 17 maart 2015. Hierbij werd het besmette sap op redelijk jong blad in de kop van de plant gesmeerd. Op 19 maart zijn met hetzelfde sap van tomatenblad ook nieuwe tomatenplanten geïnfecteerd om de besmettelijkheid van het sap te bepalen.

In tabel 1 is het behandelingsschema en in tabel 2 het bemonsteringsschema weergegeven.

De planten stonden in een kas met een ingestelde temperatuur van 20°C.

Deze speciale quarantaine afdeling heeft geen luchtramen om mogelijke verspreiding van quarantaine organismen te voorkomen. De temperatuur wordt met behulp van airconditioning gereguleerd. In de zomer kan dit betekenen dat de temperatuur midden op de dag tot maximaal 30°C kan oplopen. Dit is een uitzonderlijke situatie die door het schermen van de kas (boven het kasdek) zoveel mogelijk kan worden voorkomen.

Enmalig vier controle-planten (niet geïnfecteerd) getoetst. Later, toen deze onbesmette planten geen andere symptomen lieten zien dan de besmette planten zijn deze onbesmette planten niet meer getoetst en uit de kas verwijderd om zoveel mogelijk ruimte te maken voor de besmette planten.

Nadat alle planten waren getoetst, zijn per cultivar acht planten aangehouden die duidelijk positief (besmet) uit de toets kwamen om kasruimte te besparen. De andere planten zijn opgeruimd.

Bij de eerste twee bemonsteringen is blad geplukt dat vrij dicht boven het inoculatieblad zat. Later is hoofdzakelijk jong volgroeid blad aan de top van de plant gebruikt voor toetsing tenzij anders vermeld.

Tussendoor (juli) zijn de planten een keer getopt op ca. 30 cm hoogte om de omvang van de planten te beperken. Daarna is steeds blad van de nieuwe scheuten getoetst. Alle toetsingen zijn uitgevoerd door Naktuinbouw te Roelofarendsveen met behulp van een TaqMan RT-PCR toets volgens protocol SPN-V015.

Tabel 1. Behandelingsschema van de 1^e infectieproef.

Behandeling	cultivar	Stek	Methode besmetting
1.1.1	Garden Wonder	Oud	Controle
1.1.2	Garden Wonder	Jong	Controle
1.2.1	Garden Wonder	Oud	Carborundum
1.2.2	Garden Wonder	Jong	Carborundum
1.3.1	Garden Wonder	Oud	Snijden
1.3.2	Garden Wonder	Jong	Snijden
1.4.1	Garden Wonder	Oud	Injecteren
1.4.2	Garden Wonder	Jong	Injecteren
2.1.1	Thomas Edison	Oud	Controle
2.1.2	Thomas Edison	Jong	Controle
2.2.1	Thomas Edison	Oud	Carborundum
2.2.2	Thomas Edison	Jong	Carborundum
2.3.1	Thomas Edison	Oud	Snijden
2.3.2	Thomas Edison	Jong	Snijden
2.4.1	Thomas Edison	Oud	Injecteren
2.4.2	Thomas Edison	Jong	Injecteren
3.1.1	Mystery Day	Oud	Controle
3.1.2	Mystery Day	Jong	Controle
3.2.1	Mystery Day	Oud	Carborundum
3.2.2	Mystery Day	Jong	Carborundum
3.3.1	Mystery Day	Oud	Snijden
3.3.2	Mystery Day	Jong	Snijden
3.4.1	Mystery Day	Oud	Injecteren
3.4.2	Mystery Day	Jong	Injecteren
4.1.1	Kelvin Floodlight	Oud	Controle
4.1.2	Kelvin Floodlight	Jong	Controle
4.2.1	Kelvin Floodlight	Oud	Carborundum
4.2.2	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum
4.3.1	Kelvin Floodlight	Oud	Snijden
4.3.2	Kelvin Floodlight	Jong	Snijden
4.4.1	Kelvin Floodlight	Oud	Injecteren
4.4.2	Kelvin Floodlight	Jong	Injecteren

Tabel 2. Bemonsteringsschema 1^e infectieproef. Infectiedatum: 17-3-2015

Bemonsteringsdatum	Weken na infectie	Bijzonderheden monsters
04-05-2015	7 weken	Mengmonster per cultivar en ouderdom stek
11-05-2015	8 weken	Alle planten, met uitzondering van de meeste controle planten
16-06-2015	12 weken	Van alle cultivars één plant
13-07-2015	16 weken	Van alle cultivars één plant
04-08-2015	19 weken	Alle planten
28-09-2015	24 weken	Van alle cultivars 2 planten die op 2 plaatsen zijn bemonsterd (ouder blad en bloemknop)
09-11-2015	30 weken	Van alle cultivars 2 planten
23-11-2015	32 weken	Planten negatief op 4-8-2015

2.3 2^e infectieproef, juni 2015

Er is een tweede infectieproef uitgevoerd om vast te stellen of het infecteren van planten in verschillende seizoenen even gemakkelijk verloopt. Voor deze infectieproef zijn daarom dezelfde vier cultivars gebruikt. De stekken zijn eind april gemaakt en met één methode geïnfecteerd namelijk m.b.v. carborundum. Per cultivar zijn vier planten (herhalingen) gebruikt.

In tabel 3 is het behandelingsschema en tabel 4 het bemonsteringsschema weergegeven.

Bij het infecteren zijn ook nu weer tegelijk nieuwe tomatenplanten besmet.

Het besmetten van de planten heeft plaatsgevonden op 1 juni 2015. Daarvoor is vrij jong blad in de kop van de plant gebruikt. Deze planten waren circa zes weken oud bij infectie.

Totaal bestaat de proef uit 16 planten.

Bij de eerste bemonstering is blad geplukt dat vrij dicht boven het inoculatieblad zat. Later is hoofdzakelijk jong blad aan de top van de plant gebruikt voor toetsing tenzij anders vermeld.

Tabel 3. Behandelingsschema van de 2^e infectieproef.

behandeling	cultivar
1 t/m 4	Garden Wonder
5 t/m 8	Thomas Edison
9 t/m 12	Mystery Day
13 t/m 16	Kelvin Floodlight

Tabel 4. Bemonsteringsschema 2^e infectieproef. Infectiedatum: 01-06-2015

Bemonsteringsdatum	Weken na infectie	Bijzonderheden monsters
16-6-2015	2 weken	Alle planten (16)
29-6-2015	4 weken	Alle planten
13-7-2015	6 weken	Alle planten
4-8-2015	9 weken	Alle planten
24-8-2015	12 weken	Van elke cultivar één of twee planten op drie plaatsen: onder, midden, boven
28-9-2015	17 weken	Van 3 cultivars elk één plant
9-11-2015	23 weken	Van 3 cultivars elk één plant
23-11-2015	25 weken	Planten die negatief waren op 4-8-2015

2.4 3^e infectieproef, oktober 2015

Ook de derde infectieproef is uitgevoerd om vast te stellen of het infecteren van planten in verschillende seizoenen even gemakkelijk verloopt. Deze infectieproef is vrijwel identiek aan de tweede infectieproef. Van elke cultivar zijn vier planten met besmet sap met alleen carborundum ingewreven. Van één cultivar zijn vier extra planten besmet.

De meeste planten (16) zijn besmet op jong blad. Van de vier extra planten is oud blad besmet om vast te stellen of er een verschil in gevoeligheid is voor infectie via jong of oud blad.

Voor deze proef zijn planten gebruikt die in juli zijn gestekt en in september een keer zijn getopt. Het jonge blad dat is besmet is het oudste blad van de nieuw uitgelopen zijstelen, het oude blad dat is besmet is blad van de oorspronkelijke stek (de plant die overbleef na het toppen).

De planten zijn 26 oktober 2015 besmet toen de planten ruim 3 maanden oud waren.

In tabel 5 is het behandelingsschema en tabel 6 het bemonsteringsschema weergegeven.

Tabel 5. Behandelingsschema van de 2^e infectieproef.

behandeling	cultivar	Infectieplaats
1 t/m 4	Garden Wonder	Jong blad
5 t/m 8	Thomas Edison	Jong blad
9 t/m 12	Mistery Day	Jong blad
13 t/m 16	Kelvin Floodlight	Jong blad
17 t/m 20	Garden Wonder	Oud blad

Tabel 6. Bemonsteringsschema 3^e infectieproef. Infectiedatum: 26-10-2015

Bemonsteringsdatum	Weken na infectie	Bijzonderheden monsters
09-11-2015	2 weken	Alle planten
23-11-2015	4 weken	Alle planten
7-12-2015	6 weken	Alle planten

2.5 Optimalisatie RNA extractie uit plantmateriaal van Dahlia en toetsing op aanwezigheid van het PSTVd

Binnen de PPS Diagnostiek, onderdeel RNA extractie, en de PPS PSTVd in Dahlia, is onderzocht of er verschillen in aantoonbaarheid voor het *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ontstaan bij verschillende extractiemethoden. De RNA extracten zijn getest met drie verschillende detectiemethodieken; RT-PCR, qRT-PCR en Luminex X-tag. Hiervoor is zowel bladmateriaal als wortel en bloemblad gebruikt van PSTVd-geïnfecteerde Dahlia. Doel van dit onderzoek is het vaststellen of de detectie van PSTVd te verbeteren is.

Gezonde Dahlia planten zijn in maart 2015 geïnoculeerd met een Dahlia-isolaat van PSTVd, dat bij de NWWA werd vermeerderd in tomaat. Naktuinbouw heeft alle planten getoetst en positieve planten zijn aangehouden voor de experimenten. Op 22 mei 2015 zijn van drie bloeiende planten, van de cultivars Kelvin Floodlight, Mistery Day en Thomas Edison, blad, wortel en bloem bemonsterd. Per monster werd het plantmateriaal homogeen verdeeld en zijn drie porties van 100 mg afgewogen en ingevroren in een vriezer bij -40°C.

RNA-extractie methoden

1. Trizol (TRIzol® Reagent, Invitrogen, USA). Hierbij wordt 100 mg plantmateriaal vermalen in 1 ml Trizol reagent in een glazen pottertje. Verder verloopt de RNA extractie als aangegeven in de handleiding van de fabrikant. Het gepelleteerde RNA is opgenomen in 50 µl RNase-vrij water.

2. RNA extractie met de Qiagen RNA Plant mini kit (Qiagen, Duitsland). Het plantmateriaal is verder diepgevroren in vloeibare stikstof en vermalen in een mini bead-beater. De RNA extractie is gestart met het toevoegen van 450 µl RLT-buffer met mercaptho-ethanol, waarna de extractie is gevolgd volgens het protocol van de fabrikant. De uiteindelijke elutie van het RNA is uitgevoerd met 50 µl RNase-vrij water.

3. RNA extractie met de Qiagen RNA Plant mini kit (Qiagen, Duitsland), maar nu met extra toevoeging van de Ambion® plant RNA isolation aid (Life technologies, USA). Deze toevoeging kan stoffen die storen in de RNA extractie wegvangen en bewerkstelligen dat het geïsoleerde RNA schoner en van betere kwaliteit is. Per 100 mg plantmateriaal wordt 100 µl Ambion RNA isolation aid toegevoegd aan de RLT buffer van de Qiagen kit. Daarna wordt het materiaal 3 min. bij 56°C geïncubeerd en vervolgens in een shredder-kolom van de Qiagen kit gecentrifugeerd (5 min, 14000 rpm). Daarna wordt het protocol van de RNeasy plant mini kit verder gevolgd.

De concentraties van de geïsoleerde RNAs werden m.b.v. een RiboGreen meting bepaald. Daarnaast is de RNA oplossing visueel beoordeeld op kleur (een RNA oplossing behoort helder te zijn).

Vervolgens werden de RNA-isolaties getest op PSTVd met drie verschillende detectiemethoden:

1. Conventionele RT-PCR
2. qRT-PCR (TaqMan)
3. Luminex X-tag multiplex pospiviroïde assay (PRI)

3 Resultaten

3.1 1^e infectieproef (maart 2015)

3.1.1 Visuele waarnemingen

De meeste planten vertoonden lichte symptomen van Dahlia-mozaïekvirus. Andere symptomen zijn niet waargenomen. Er was geen verschil in symptoomvorming tussen de niet-besmette controle planten en de met PSTVd geïnfecteerde planten.

Dit bevestigt de eerdere waarnemingen dat PSTVd symptoomloos voorkomt in Dahlia.

3.1.2 Toetsingsresultaten

Bij aanvang van het onderzoek is het sap van de geïnfecteerde tomatenbladeren dat gebruikt is als inoculum getoetst. Dit bleek positief te zijn met een Ct-waarde van 7.1.

In tabel 7 zijn de toetsresultaten van de eerste mengmonstertoetsing weergegeven uitgevoerd zeven weken na inoculatie. In de tabel is te zien dat vrijwel alle mengmonsters duidelijk besmet zijn met PSTVd. Naar aanleiding van deze resultaten is besloten om daarna alle planten individueel te gaan toetsen.

Ook de tomaten van de NVA die als inoculum zijn gebruikt waren duidelijk geïnfecteerd evenals de tomatenplanten die gelijk met de Dahlia zijn besmet.

Tabel 7. Resultaten eerste toetsing (mengmonster), 4-5-2015, 7 weken na infectie.

behandeling	cultivar	stek	besmetting	uitslag
	Tomaat NVA			+
	Tomaat infectie 19-3-2015			+
1.2.2+1.3.2+1.4.2	Garden Wonder	Jong	Carborundum + snijden + injecteren	+
1.2.1+1.3.1+1.4.1	Garden Wonder	Oud	Carborundum + snijden + injecteren	+
2.2.2+2.3.2+2.4.2	Thomas Edison	Jong	Carborundum + snijden + injecteren	+
2.2.1+2.3.1+2.4.1	Thomas Edison	Oud	Carborundum + snijden + injecteren	+
3.2.2+3.3.2+3.4.2	Mystery Day	Jong	Carborundum + snijden + injecteren	+/-
3.2.1+3.3.1+3.4.1	Mystery Day	Oud	Carborundum + snijden + injecteren	+
4.2.2+4.3.2+4.4.2	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum + snijden + injecteren	+
4.2.1+4.3.1+4.4.1	Kelvin Floodlight	Oud	Carborundum + snijden + injecteren	+

+ = positief = PSTVd aangetoond

+/- = twijfelwaarde = PSTVd niet aangetoond, een zwak signaal

In tabel 8 zijn de verdere toetsingsresultaten van deze infectieproef per datum van monsternamen weergegeven.

Tabel 8. Resultaten toetsing alle planten bemonsterd op 11-05-2015, 8 weken na infectie.

Behandeling	cultivar	Stek	Besmetting	Plant A	Plant B	Plant C	Plant D	% besmet
1.1.1	Garden Wonder	Oud	Controle					
1.1.2	Garden Wonder	Jong	Controle					
1.2.1	Garden Wonder	Oud	Carborundum	+	-	-	-	25
1.2.2	Garden Wonder	Jong	Carborundum	+	+	+	+	100
1.3.1	Garden Wonder	Oud	Snijden	-	-	+	+	50
1.3.2	Garden Wonder	Jong	Snijden	+	+	-	+	75
1.4.1	Garden Wonder	Oud	Injecteren	-	-	+	+	50
1.4.2	Garden Wonder	Jong	Injecteren	-	-	+	-	25
2.1.1	Thomas Edison	Oud	Controle					
2.1.2	Thomas Edison	Jong	Controle					
2.2.1	Thomas Edison	Oud	Carborundum	+	+	+	+	100
2.2.2	Thomas Edison	Jong	Carborundum	+	+	+	+	100
2.3.1	Thomas Edison	Oud	Snijden	-	+	+	+	75
2.3.2	Thomas Edison	Jong	Snijden	+	-	+	+	75
2.4.1	Thomas Edison	Oud	Injecteren	+	+	+	-	75
2.4.2	Thomas Edison	Jong	Injecteren	-	+	-	-	25
3.1.1	Mystery Day	Oud	Controle					
3.1.2	Mystery Day	Jong	Controle	-	-	-	-	0
3.2.1	Mystery Day	Oud	Carborundum	-	+	+	+	75
3.2.2	Mystery Day	Jong	Carborundum	+	+	+	+	100
3.3.1	Mystery Day	Oud	Snijden	+	+	+	+	100
3.3.2	Mystery Day	Jong	Snijden	-	-	-	+	25
3.4.1	Mystery Day	Oud	Injecteren	-	+	-	+	50
3.4.2	Mystery Day	Jong	Injecteren	-	+	+	-	50
4.1.1	Kelvin Floodlight	Oud	Controle					
4.1.2	Kelvin Floodlight	Jong	Controle					
4.2.1	Kelvin Floodlight	Oud	Carborundum	-	+	+	+	75
4.2.2	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum	+	+	+	+	100
4.3.1	Kelvin Floodlight	Oud	Snijden	-	+	-	+	50
4.3.2	Kelvin Floodlight	Jong	Snijden	-	-	+	-	25
4.4.1	Kelvin Floodlight	Oud	Injecteren	-	-	+	+	50
4.4.2	Kelvin Floodlight	Jong	Injecteren	+	+	+	+	100

+ = besmet (positief)

- = onbesmet of twijfelwaarde (negatief)

Bij de toetsing wordt een Ct-waarde verkregen die een maat is voor de concentratie viroïde in de plant. Een Ct-waarde <32 geeft aan dat een plant besmet is. Bij een Ct-waarde van < 12 is een plant zeer besmet, er is een hoge concentratie aan viroïde aanwezig. Bij een Ct-waarde van 32 tot 37 wordt er wel iets gemeten maar is de waarde dermate laag dat het kan duiden op een besmette omgeving. Dit wordt in het onderzoek een twijfelwaarde genoemd.

De planten in tabel 8 die positief zijn hebben gemiddeld een Ct-waarde van iets minder dan 18 wat een duidelijke besmetting aanduidt. De Ct-waarde varieert van 11 tot 29.

In tabel 8 is te zien dat in de enige controle behandeling die is onderzocht (3.1.2) ook inderdaad geen PSTVd kon worden aangetoond. Bij een aantal behandeling zijn alle vier de planten positief.

Na variantie-analyse is gebleken dat één variabele tot betrouwbare verschillen te leiden: de methode van infecteren. Infecteren met behulp van carborundumpoeder zorgt voor een hoger percentage geïnfecteerde planten (84,4%) dan de andere twee methoden (53,1% door injecteren en 59,4% door snijden). Er was geen betrouwbaar effect van de cultivar of ouderdom van het stek (de plant) op het percentage besmette planten.

Door het insmeren van Dahliaplanten met besmet sap met carborundumpoeder in maart werd bijna 85% van de planten besmet. Dit was vanaf 7 weken, maar zeker 8 weken na besmetten goed aantoonbaar.

Tabel 9. Toetsing enkele planten 1^e infectieproef in de loop van het seizoen.

Behandeling	cultivar	Stek	Besmetting	11-5	16-6	13-7
1.3.2 A	Garden Wonder	Jong	Snijden	+	+	+
2.2.2 A	Thomas Edison	Jong	Carborundum	+	+	+
3.2.1 B	Mystery Day	Oud	Carborundum	+	+	+
4.2.2 A	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum	+	+	+

Ct-waarde tussen de 10 en 17 bij alle metingen.

De vier uitgekozen planten die op 11 mei zijn bemonsterd en positief waren, waren ook bij bemonstering op 16 juni en 13 juli positief. Daarop is besloten om op 4 augustus van elke cultivar de 8 positief getoetste planten van 11 mei nogmaals te toetsen (inclusief de 4 planten die ook in juni en juli zijn getoetst).

Tabel 10. Toetsresultaten enkele planten bemonsterd op 4 augustus. Planten waren positief op 11 mei.

Behandeling	cultivar	Stek	Besmetting	Plant A	Plant B	Plant C	Plant D
1.2.2	Garden Wonder	Jong	Carborundum	-	+	+	-
1.3.2	Garden Wonder	Jong	Snijden	+	+		+
1.4.1	Garden Wonder	Oud	Injecteren			+	
2.2.2	Thomas Edison	Jong	Carborundum	+	+	+	+
2.3.2	Thomas Edison	Jong	Snijden	+		+	+
2.4.2	Thomas Edison	Jong	Injecteren		+		
3.2.1	Mystery Day	Oud	Carborundum		+	+	+
3.3.1	Mystery Day	Oud	Snijden	+	+	-	+
3.3.2	Mystery Day	Jong	Snijden				+
4.2.2	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum	+	+	+	+
4.4.2	Kelvin Floodlight	Jong	Injecteren	-	+	+	+

Vier van de 16 planten waren negatief bij toetsing op 4 augustus terwijl ze in mei nog positief waren. Op 28 september zijn van elke cultivar die positief was bij toetsen op 4 augustus monsters genomen van zowel het blad als de bloemknop. In tabel 11 is te zien dat bij de planten die op 4 augustus positief waren op 28 september zowel het blad als de bloemknop positief waren. Daarna was ook het blad op 9 november positief.

Tabel 11. Planten bemonsterd op 28 september, aan blad én bloemknop en 9 november alleen blad.

Behandeling	cultivar	Stek	Besmetting	28-9, blad	28-9, knop	9-11, blad
1.2.2 B	Garden Wonder	Jong	Carborundum	+	+	+
1.3.2 A	Garden Wonder	Jong	Snijden	+	+	+
2.2.2 A	Thomas Edison	Jong	Carborundum	+	+	+
2.2.2 B	Thomas Edison	Jong	Carborundum	+	+	+
3.2.1 B	Mystery Day	Oud	Carborundum	+	+	+
3.2.1 C	Mystery Day	Oud	Carborundum	+	+	+
4.2.2 A	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum	+	+	+
4.2.2 B	Kelvin Floodlight	Jong	Carborundum	+	+	+

Op 23 november zijn de planten die op 4 augustus negatief uit de toets kwamen nogmaals getoetst om vast te stellen of ze echt niet besmet waren (tabel 12). Eén van de vier planten gaf een duidelijk positief signaal en bleek alsnog besmet. De andere drie planten gaven twijfelwaarden en moeten als niet-besmet worden beschouwd. Het is niet duidelijk waarom deze planten bij toetsing op 11 mei wel positief waren. Mogelijke verklaring zijn: de besmetting is niet systemisch geworden, er heeft een kruisbesmetting plaatsgevonden, het geïnoculeerde blad is bemonsterd.

Tabel 12. Planten bemonsterd op 23 november. Deze planten waren negatief op 4-8-2015.

Behandeling	cultivar	Stek	Besmetting	23-11
1.2.2 A	Garden Wonder	Jong	Carborundum	-
1.2.2 D	Garden Wonder	Jong	Carborundum	-
3.3.1 C	Mystery Day	Oud	Snijden	-
4.4.2 A	Kelvin Floodlight	Jong	Injecteren	+

3.2 2^e infectieproef (juni 2015)

3.2.1 Visuele waarnemingen

Net als in de 1^e infectieproef zijn ook bij deze planten geen virussymptomen, anders dan dahliamozaïekvirus waargenomen. Er was hooguit een lichte necrose te zien op de bladeren die met carborundumpoeder waren ingewreven.

3.2.2 Toetsresultaten

Bij de eerste bemonstering zijn bladeren vrij kort boven de geïnoculeerde bladeren getoetst. Voor alle latere toetsingen zijn de grotere bladeren in de top van de plant gebruikt.

In tabel 13 is te zien dat de tomaat die in maart is besmet en als besmettingsbron heeft gediend bij elke toetsing aantoonbaar besmet bleek te zijn. De tomaat die in juni tegelijk met de Dahlia is besmet was alleen 2 weken na besmetting positief en gaf daarna alleen nog maar negatieve uitslagen of twijfelwaarden (= ook negatief).

De besmetting lijkt alleen in de cultivar Thomas Edison goed aangeslagen te zijn hoewel ook daar 6 weken na inoculatie veel negatieve waarden zijn gevonden.

De besmetting in juni lijkt niet zo goed aangeslagen als de besmetting in maart.

Tabel 13. Toetsingsresultaten met datum en aantal weken na inoculeren van de planten.

Datum inoculatie: 1 juni 2015

behandeling	cultivar	16-6 2 weken	29-6 4 weken	13-7 6 weken	4-8 9 weken	28-9 17 weken	9-11 23 weken	23-11 25 weken
1	Garden Wonder	+	-	-	-	n.g.**	n.g.	-
2	Garden Wonder	-	-	+	-	n.g.	n.g.	-
3	Garden Wonder	+	-	-	-	n.g.	n.g.	-
4	Garden Wonder	-*	-	-	+	+	+	n.g.
5	Thomas Edison	-	+	-	+	n.g.	n.g.	n.g.
6	Thomas Edison	-	+	+	+	n.g.	n.g.	n.g.
7	Thomas Edison	-	+	-	+	+	+	n.g.
8	Thomas Edison	+	-	-	+	n.g.	n.g.	n.g.
9	Mystery Day	-	-	-	-	n.g.	n.g.	+
10	Mystery Day	-	-	-	-	n.g.	n.g.	+
11	Mystery Day	-	-	-	-	n.g.	n.g.	dood
12	Mystery Day	-	-	-	-	n.g.	n.g.	dood
13	Kelvin Floodlight	-	+	-	-	+	+	+
14	Kelvin Floodlight	-	-	-	-	n.g.	n.g.	-
15	Kelvin Floodlight	-	+	-	+	n.g.	n.g.	n.g.
16	Kelvin Floodlight	-	-	-	-	n.g.	n.g.	-
	Tomaat maart geïnfecteerd	+	+	+	+	+	+	n.g.
	Tomaat juni geïnfecteerd	+	+/-	-	+/-	+/-	n.g.	n.g.

* = vrijwel alle negatieve waarden op 16-6 waren twijfelwaarden.

** = niet getoetst

Op 24 augustus 2015 zijn een aantal planten op verschillende plaatsen bemonsterd: onderin, halverwege en de top van de plant. Het betrof planten die veelal eerder positief of met wisselende waarden zijn getoetst. De resultaten in tabel 14 komen redelijk overeen met die uit tabel 13. Als een plant eerder positief was getoetst werd deze nu veelal ook positief getoetst. Vrijwel alle planten waren nu over de gehele plant positief óf negatief. Opvallend was dat de in juni geïnoculeerde tomaat na een positieve reactie 2 weken na besmetting later veelal negatief werd getoetst.

Tabel 14. Resultaten toetsing op verschillende plaatsen aan de plant op 24 augustus 2015.

behandeling	cultivar	onder	midden	Boven
2	Garden Wonder	-	-	-
4	Garden Wonder	+	+	+
7	Thomas Edison	+	+	+
9	Mystery Day	-	-	-
13	Kelvin Floodlight	+	+	+
15	Kelvin Floodlight	-	+	+
	Tomaat maart geïnfecteerd			+
	Tomaat juni geïnfecteerd			-

Enkele planten die op 24-8-2015 positief waren, waren ook in de weken daarna steeds positief bij toetsing (zie tabel 13 data 28-9 en 9-11).

Op 23 november zijn de planten die op 4 augustus negatief waren (niet besmet bleken te zijn) nogmaals getoetst om vast te stellen of ze echt niet besmet zijn. Een aantal planten die eerder negatief uit de toets kwamen waren nu wel positief (zie tabel 13 data 23-11).

3.3 3^e infectieproef (oktober 2015)

3.3.1 Visuele waarnemingen

Aan de planten zijn alleen symptomen van Dahliamozaïekvirus waargenomen en geen andere symptomen.

3.3.2 Toetsresultaten

Alle planten zijn 2, 4 en 6 weken na inoculatie getoetst om vast te stellen of ze besmet waren (tabel 15).

Tabel 15. Resultaten toetsing 2, 4 en 6 weken na inoculatie in oktober.

behandeling	cultivar	Infectieplaats	9-11 (2 weken)	23-11 (4 weken)	7-12 (6 weken)
101	Garden Wonder	Jong blad	- (+/-)	-	-
102	Garden Wonder	Jong blad	- (+/-)	- (+/-)	- (+/-)
103	Garden Wonder	Jong blad	- (+/-)	-	- (+/-)
104	Garden Wonder	Jong blad	-	-	+
105	Thomas Edison	Jong blad	-	-	-
106	Thomas Edison	Jong blad	-	-	- (+/-)
107	Thomas Edison	Jong blad	- (+/-)	-	- (+/-)
108	Thomas Edison	Jong blad	-	-	- (+/-)
109	Mistery Day	Jong blad	-	-	- (+/-)
110	Mistery Day	Jong blad	- (+/-)	-	-
111	Mistery Day	Jong blad	-	- (+/-)	+
112	Mistery Day	Jong blad	-	- (+/-)	-
113	Kelvin Floodlight	Jong blad	- (+/-)	- (+/-)	- (+/-)
114	Kelvin Floodlight	Jong blad	- (+/-)	-	- (+/-)
115	Kelvin Floodlight	Jong blad	-	- (+/-)	-
116	Kelvin Floodlight	Jong blad	-	-	- (+/-)
117	Garden Wonder	Oud blad	-	-	-
118	Garden Wonder	Oud blad	-	- (+/-)	- (+/-)
119	Garden Wonder	Oud blad	- (+/-)	-	-
120	Garden Wonder	Oud blad	- (+/-)	-	- (+/-)
	Tomaat maart geïnfecteerd		+	1)	- (+/-)

+/-= twijfelwaarde = negatief

1)= niet getoetst

Zes weken na inoculatie is de eerste positieve (besmette) plant aangetoond. Er waren veel twijfelwaardes die kunnen duiden op zeer lage concentraties PSTVd in de plant.

3.4 Resultaten optimalisatie extractie methodes en verschillende toetsen

In tabel 16 zijn de resultaten te zien van de verschillende extractie- en toetsingsmethodes. De daarin vermelde

qRT-PCR methode is de standaard methode die bij Naktuinbouw wordt aangehouden voor het aantonen van PSTVd in (blad)plantmateriaal.

Tabel 16. Resultaten extractie en toetsing.

cultivar	weefsel	extractie	RT-PCR	qRT-PCR	Luminex
Kelvin Floodlight	wortel	Q	-	+	+
Kelvin Floodlight	wortel	A	-	+	+
Kelvin Floodlight	wortel	T	-	-*	+/-
Kelvin Floodlight	blad	Q	+++	+	+
Kelvin Floodlight	blad	A	+++	+	+
Kelvin Floodlight	blad	T	-	-*	+/-
Kelvin Floodlight	bloemblad	Q	++	+	+
Kelvin Floodlight	bloemblad	A	+++	+	+
Kelvin Floodlight	bloemblad	T	-	+	+
Mistery Day	wortel	Q	-	+	+
Mistery Day	wortel	A	-	+	+
Mistery Day	wortel	T	-	-*	+
Mistery Day	blad	Q	+++	+	+
Mistery Day	blad	A	+++	+	+
Mistery Day	blad	T	-	-*	+/-
Mistery Day	bloemblad	Q	+++	+	+
Mistery Day	bloemblad	A	+++	+	+
Mistery Day	bloemblad	T	+	+	+
Thomas Edison	wortel	Q	-	+	+
Thomas Edison	wortel	A	-	+	+
Thomas Edison	wortel	T	-	-*	-
Thomas Edison	blad	Q	+++	+	+
Thomas Edison	blad	A	+++	+	+
Thomas Edison	blad	T	-	-*	-
Thomas Edison	bloemblad	Q	+++	+	+
Thomas Edison	bloemblad	A	+++	+	+
Thomas Edison	bloemblad	T	+	+	+

* De interne controle van de toets reageerde evenmin, dit duidt op een storing. Als de interne controle niet reageert kan er geen uitslag worden afgegeven.

In tabel 16 is te zien dat PSTVd in alle delen van de plant (wortel, blad en bloemblad) kon worden aangetoond.

De extractie van de wortel was het lastigste: dit extract kleurde bruin. De mate van bruinverkleuring was afhankelijk van de extractiemethode. De Trizol-extractie gaf de meeste bruinverkleuring.

De RT-PCR werd het meeste verstoord door de bruinverkleuring, de andere toetsmethoden hadden daar minder last van.

4 Discussie en conclusies

De PCR-toetst (qRT-PCR) zoals Naktuinbouw die gebruikt voldoet om besmetting in blad aan te tonen. Niet alleen in de tomatenplanten zoals ontvangen van de NVWA, maar ook in de tomatenplanten die in het onderzoek in maart 2015 zijn besmet is bij elke toetsing t/m 9 november PSTVd aangetoond. Ook in besmette dahliaplanten is vanaf 8 weken na besmetting (11 mei) t/m 9 november steeds PSTVd aangetoond. Daarmee is aangetoond dat de toets op Dahliablod goed werkt.

Voor de optimalisatie van de extractie zijn drie methodes gebruikt waarvan er één minder goed werkte (Trizol-extractie), omdat deze bruinverkleuring geeft (bruinverkleuring niet kon voorkomen) wat de PCR verstoort. De standaard door Naktuinbouw gehanteerde qRT-PCR toets had weinig last van de bruinverkleuring. Ook de Luminex methode reageerde goed op de verschillende extractiemethodes.

PSTVd kan onder de proefomstandigheden in een kas met een ingestelde temperatuur van 20°C over een lange periode in Dahlia worden aangetoond, vanaf besmetting in maart is PSTVd aangetoond van mei t/m eind november. Dit komt niet overeen met de eerdere waarnemingen in de praktijk (op het veld) waarbij het viroïde goed werd aangetoond in juli en augustus maar moeizaam in september. Het is mogelijk dat de temperatuur van invloed is op de ontwikkeling en daarmee de aantoonbaarheid van PSTVd. Het is bekend van viroïden dat bij hoge temperaturen hogere concentraties worden opgebouwd. Dit moet bij Dahlia via onderzoek worden bevestigd.

Het is goed gelukt om Dahliaplanten in maart via sap te besmetten met PSTVd. Dit betrof relatief jonge (2 maanden) maar ook oude stekken/planten (4 maanden). Er was geen betrouwbaar verschil in infectiegevoeligheid tussen de twee type stekken/planten. Oudere stekken werden even gemakkelijk geïnfecteerd als jongere stekken.

Er was ook geen betrouwbaar verschil in gevoeligheid voor PSTVd tussen de verschillende cultivars. Hierbij moet wel worden bedacht dat het onderzoek met een beperkte hoeveelheid planten is uitgevoerd. Wanneer meer planten worden gebruikt kan niet worden uitgesloten dat sommige cultivars vatbaarder blijken te zijn dan anderen.

Er is wel een betrouwbaar verschil gevonden tussen de wijze van infecteren. Besmetten door blad in te wrijven met besmet sap met behulp van carborundumpoeder was effectiever dan aansnijden met een besmet mes of injecteren van besmet sap direct in de plant. Na besmetting (in maart) met carborundum was circa 85% van de planten besmet, met de ander methodes circa 50 tot 60%.

De twee latere infectiedata (juni en oktober) waren minder succesvol om planten te besmetten. Van de infectieproef in juni zijn van de 16 planten uiteindelijk vijf planten (circa 30%) besmet. Het gebruikte sap was zwaar besmet en de methode was eerder wel succesvol. Ook waren de planten vrij jong wat over het algemeen gunstig is om te besmetten. Blijkbaar zijn andere (klimaat-) omstandigheden sterk van invloed op het aanslaan van het viroïde in de plant.

Op basis van het onderzoek in 2015 lijkt het erop dat Dahlia in het voorjaar ontvankelijker is voor besmetting dan later in het seizoen in juni of oktober. Of dit wordt veroorzaakt door de gevoeligheid van de plant of de (klimaat-)omstandigheden kan niet worden gezegd.

Als een plant besmet is, is PSTVd over het algemeen in de gehele plant aantoonbaar van wortel, blad onder tot boven in de plant en de bloembledjes. Dit is op verschillende momenten waargenomen bij planten besmet in maart en juni. Het staat nog niet vast of de verdeling van het viroïde altijd mooi egaal in de plant is verdeeld.

In dit onderzoek was PSTVd zeven tot negen weken na infectie goed aantoonbaar. In de tweede infectieproef (juni) zijn twee en vier weken na infectie soms al positieve reacties waargenomen die later niet reproduceerbaar waren. Blijkbaar wordt niet elke infectie systemisch en is het viroïde later niet meer aantoonbaar.