

Onderzoek naar verspreiding van TVX via water, mijten en bodemgebonden vectoren

Maarten de Kock, Suzanne Lommen, Miriam Lemmers, Khanh Pham en Wendy Martin

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 340751 00/PT nr.13630
Februari 2012

© 2012 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 340751 00
PT Projectnummer: 13630

De bloembollensector investeert in dit project via het  **Productschap Tuinbouw**

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 21
Fax : +31 252 – 46 21 00
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INTRODUCTIE	7
1.1 Bestaande kennis	7
1.2 Aanleiding van onderzoek	8
1.2.1 Onderzoek naar mijten als vector van TVX	8
1.2.2 TVX waardplantenonderzoek en verspreiding via de grond	8
1.2.3 TVX verspreiding via water.....	9
1.3 Dit onderzoek.....	9
2 GEBRUIKTE METHODES VOOR AANTONEN TVX.....	11
2.1 Serologische detectie van TVX m.b.v. ELISA	11
2.2 Moleculaire detectie van TVX m.b.v. PCR	11
2.3 Statistische analyse besmettingspercentages	12
3 WAARDPLANTENONDERZOEK TVX	13
3.1 Literatuuronderzoek	13
3.2 Onkruidanalyse op tulpenpercelen	13
3.3 Discussie en conclusies	14
4 RISICO'S OP TVX-VERSPREIDING TIJDENS VERWERKEN, SPOELEN EN PELLEEN	17
4.1 Introductie.....	17
4.2 Materiaal en methode.....	17
4.3 Resultaten en discussie	20
4.4 Conclusie	21
5 RISICO'S TIJDEN WATERBROEI.....	23
5.1 Introductie.....	23
5.2 Materiaal en methode.....	23
5.3 Resultaten en discussie	25
5.4 Conclusie	26
6 VIRUSOVERDRACHT DOOR MIJTEN	27
6.1 Algemene introductie	27
6.2 TVX overdracht in de bewaring 2007.....	28
6.2.1 Introductie.....	28
6.2.2 Materiaal en methoden	28
6.2.3 Resultaten.....	28
6.2.4 Conclusies & discussie.....	28
6.3 TVX overdracht in het laboratorium 2009	30
6.3.1 Introductie.....	30
6.3.2 Materiaal en methoden	30
6.3.3 Resultaten	31
6.3.4 Conclusies & discussie.....	32
6.4 TVX overdracht in de bewaring 2010.....	33
6.4.1 Introductie.....	33
6.4.2 Materiaal en methoden	33

6.4.3	Proef TVX overdracht na infectie met tulpengalmijt	33
6.4.4	Proef TVX overdracht na infectie met bollenmijten en stromijten	34
6.4.5	Verspreiding van TVX in de kas	36
6.4.6	Data-analyse	36
6.4.7	Resultaten	37
6.4.8	Discussie en conclusies	47
6.5	Algemene conclusie	49
6.6	Aanbevelingen voor de praktijk	49
6.7	Bijlagen - Virusoverdracht door mijten	50
7	VIRUSOVERDRACHT DOOR BODEMGEBONDEN VECTOREN	53
7.1	Risico's TVX-geïnfecteerd bladmateriaal	53
7.1.1	Introductie	53
7.1.2	Werkwijze	53
7.1.3	Resultaten en discussie	53
7.1.4	Conclusie	54
7.2	Betrokkenheid nematoden	54
7.2.1	Introductie	54
7.2.2	Werkwijze	54
7.2.3	Resultaten en Discussie	55
7.2.4	Conclusies	55
7.3	Betrokkenheid van schimmels	55
7.4	Bodemgebonden verspreiding TVX – maar hoe?	57
8	MAATREGELEN VOOR DE PRAKTIJK	59
9	REFERENTIES	61
10	OUTPUT	63

Samenvatting

Uit eerder onderzoek aan *Tulpenvirus X* (TVX) was al bekend dat dit virus tijdens de bewaring van tulpenbollen door tulpengalmijt wordt verspreid. Tevens is er tijdens het koppen en ontbollen een risico op verspreiding van dit virus. Dit rapport beschrijft onderzoek naar enkele extra routes voor mechanische verspreiding van TVX tijdens met name de verwerking van bollen en waterbroei. Dit rapport beschrijft tevens onderzoek naar de betrokkenheid van bollen- en stromijt bij de verspreiding van TVX tijdens de bewaring. Waardplanten-analyse en onderzoek naar verspreidingsroutes via de grond heeft tot zeer interessante nieuwe inzichten geleid.

Risico's op mechanische verspreiding van TVX tijdens spoelen, pellen en waterbroei

TVX kan via verwonding/beschadiging van planten of bollen verspreiden. Het was al bekend dat tijdens het machinaal koppen TVX-verspreiding kan optreden. De virustoeename blijft, afhankelijk van weersomstandigheden, beperkt tot maximaal enkele procenten. Dit onderzoek heeft ook aangetoond dat er tijdens mechanisch pellen, spoelen en waterbroei op prikbakken bij een TVX-geïnfecteerde partij geringe verspreiding van TVX kan plaatsvinden. Bij mechanisch pellen en spoelen is er zowel risico voor TVX-verspreiding binnen partijen als tussen partijen. Een virusvrije partij kan dus via deze weg virusgeïnfecteerd raken. De mate van virusverspreiding tijdens mechanisch pellen en spoelen is relatief laag en blijft bij aanwezigheid van een infectiebron beperkt tot maximaal een enkele procent. Bij waterbroei is de mate van virusverspreiding ook gering; tijdens dit onderzoek maximaal 1 tot 2%.

Verspreiding via mijten

Het grootste risico op infectie met TVX loopt een partij echter pas daarna, vanaf de bewaring. In de proeven liep een gezonde partij binnen een enkel seizoen zelfs een TVX-besmetting op van 72%. Verspreiding van TVX blijkt voor een belangrijk deel te worden veroorzaakt door tulpengalmijt in de bewaring. Bij aanwezigheid van tulpengalmijt kan TVX zich binnen én tussen partijen aanzienlijk verspreiden. In laboratoriumproeven bleek ook bollenmijt (*Rhizoglyphus echinopus*) in staat om TVX over te dragen en uit voorgaand onderzoek was ook de stromijt (*Tyrophagus putrescentiae*) al een verdachte vector. In het huidige onderzoek is echter niet aangetoond dat bollenmijten en stromijten een grote rol spelen als vector van TVX in de bewaring. Sterker nog, het toevoegen van bollenmijten of stromijten in de bewaring resulteerde in verminderde schade door tulpengalmijt: zowel symptomen van tulpengalmijt als verspreiding van TVX bleven beperkt. Het is dus van groot belang om tulpengalmijt te voorkomen en indien nodig op de juiste wijze te bestrijden.

Een deel van de TVX-infecties in een vollegrondskas was niet te verklaren door overdracht in de bewaring. Er zijn sterke aanwijzingen dat TVX zich ook na bewaring nog kan verspreiden. Het onderzoek suggereert dat een onbekende bodemgebonden vector verantwoordelijk is voor deze nieuwe verspreidingsroute.

Bodemgebonden verspreiding van TVX

Drie verschillende resultaten geven aanwijzingen voor verspreiding via de grond. In het onderzoek zijn virusvrije tulpen met TVX geïnfecteerd geraakt wanneer deze werden geteeld op grond waar bladresten van TVX-geïnfecteerde planten doorheen zijn gefreesd. 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. Daarnaast zijn tijdens de teelt van virusvrije- en TVX-tulpen in een vollegrondskas sterke aanwijzingen verkregen voor bodemgebonden 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 via verwonding kunnen plaatsvinden. De verspreiding 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. Als laatste heeft na het rooien van deze twee proeven spontane onkruidgroei kunnen plaatsvinden. In het blad van de spontaan opgekomen brandnetel is TVX aangetoond.

Dit resultaat suggereert dat de virusvector na de teelt van viruszieke tulpen in de grond aanwezig is gebleven en in een volgend vatbaar gewas tot infecties met TVX heeft gezorgd. Er zijn dus diverse concrete aanwijzingen voor verspreiding van TVX via een bodemgebonden vector.

Waardplantenonderzoek

Er is een lijst van waardplanten voor TVX opgesteld. Deze lijst toont aan dat TVX zeker geen virus is dat alleen in tulp voor kan komen. Met name onkruiden als *Chenopodium album* (melganzenvoet), *Trifolium incarnatum* (klaver), *Viola species* (wilde viooltjes) en *Urtica urens* (kleine brandnetel) zijn frequent voorkomende akkeronkruiden die tijdens de teelt ook tussen het tulpengewas aanwezig kunnen zijn wanneer de onkruidbeheersing onvoldoende is. TVX is daadwerkelijk aangetroffen in melganzenvoet en kleine brandnetel. Het gegeven dat TVX ook in andere gewassen dan tulp kan voorkomen, aangevuld met verkregen resultaten met brandnetel, suggereert lokale verspreiding van plant tot plant, zelfs over teelten heen. Er zijn risico's voor nieuwe TVX infecties in tulp wanneer er daadwerkelijk virusoverdracht van een TVX-geïnfekteerde tulp naar dit type onkruiden kan plaats vinden en vice versa. Het TVX-geïnfekteerde onkruid dient dan als virusreservoir. De resultaten uit dit onderzoek tonen aan dat er virusreservoirs voor TVX in wilde planten/onkruiden aanwezig kunnen zijn. Uitgebreide praktijkmonitoring is nodig om de omvang van deze reservoirs te bepalen.

Conclusie

De mate waarin TVX-verspreiding in de praktijk optreedt, is een optelsom van kleine risico's als gevolg van mechanische beschadiging tijdens teelt en verwerking. Virusverspreiding door tulpengalmijt of de nog onbekende bodemgebonden vector lijkt veel effectiever te zijn dan de mechanische verspreiding tijdens de teelt en verwerking. Het rapport bevat een opsomming van maatregelen waarmee verspreiding van TVX te voorkomen of te beperken is.

1 Introductie

1.1 Bestaande kennis

De export van tulpen naar bijvoorbeeld Japan staat de laatste jaren onder druk door een toenemend percentage Tulpenvirus X (TVX). In 2004 is bij monsterkeuring door de BKD in 98 monsters TVX aangetroffen. Het afgekeurde areaal wegens meer dan 1.0% TVX is gestegen van 3 ha in 2000 via 23 ha in 2004 naar 45 ha in 2007. Sindsdien schommelt de oppervlakte die vanwege TVX wordt afgekeurd tussen de 37 en 45 hectare (bron: Bloembollenkeuringsdienst). In 2011 werd 42 hectare vanwege TVX afgekeurd (meer dan 1% TVX). Opvallend is dat de helft van dit areaal zwaar besmette partijen betreft (>4%).

Uit onderzoek in de jaren '90 door Dhr. Asjes en collega's bij PPO-BBF kwam de tulpengalmijt als vector van TVX naar voren. De tulpengalmijt veroorzaakt niet alleen schade aan de bol, maar zorgt tijdens de bewaring van bollen ook voor de verspreiding van TVX. Door de toename van TVX in de praktijk, zelfs op bedrijven waar geen tulpengalmijt is waargenomen, werd er nog steeds getwijfeld of TVX alleen verspreid wordt door de tulpengalmijt tijdens de bewaring of dat er ook andere verspreidingsroutes zijn.

Het TVX behoort tot de potexvirussen, virussen waarvan bekend is dat ze op mechanische wijze via verwonding van de plant worden verspreid. In de praktijk bestaat daarnaast het vermoeden dat hoge aantallen stro- en bollenmijten verantwoordelijk zijn voor virusoverdracht. Deze mijtensoorten veroorzaken mechanische beschadigingen, terwijl galmijten met hun monddelen dieper het weefsel ingaan (prikken). Dit maakt het op het eerste gezicht onwaarschijnlijker dat stro- en bollenmijten ook verantwoordelijk kunnen zijn voor virusoverdracht naast galmijten. Deze verspreidingswijze is wel weer aannemelijker wanneer TVX ook langs mechanische weg wordt verspreid. Tijdens de teelt van tulp vindt er daarnaast uitgebreide mechanische schade en verwonding plaats tijdens het koppen en klepelen van het gewas. Deze gewasbehandelingen kunnen daarmee tevens een potentiële bron voor virusverspreiding zijn. In PT-projecten 12271 en 13062 is onderzoek gedaan om andere TVX-verspreidingsroutes te leren kennen. In de volgende alinea's wordt een korte samenvatting gegeven van deze onderzoeksprojecten.

Bedrijfsevaluatie (PT project 12271)

Tijdens een bedrijfsevaluatie is geen duidelijkheid ontstaan over mogelijke infectiebronnen voor TVX anders dan reeds geïnfecteerde tulpen. Op de betrokken bedrijven werd tijdens de bewaring de bekende vector van TVX, de tulpengalmijt, efficiënt bestreden. Wel komen stro- en bollenmijt vaak in grote getale voor. Er is echter geen duidelijk verband tussen de mijtenbestrijding door middel van verschillende manieren van begassing, de toegepaste bedrijfshygiëne en de populaties stro- en bollenmijten die tijdens de bewaring worden waargenomen. Bij de telers bestaat er een sterk vermoeden dat er meer vectoren zijn voor TVX dan alleen de tulpengalmijt en men vermoedt dan ook de betrokkenheid van de andere mijtensoorten.

Mechanische verspreiding van TVX tijdens het koppen (PT project 12271 & 13062)

In gerichte experimenten is duidelijk aangetoond dat TVX tijdens het koppen verspreid kan worden. Bij laat koppen is het gewas extra vatbaar voor deze mechanische verspreiding van TVX. Het blijkt dat sommige cultivars gevoeliger zijn voor mechanische verspreiding tijdens het koppen dan andere cultivars. Ook zijn er aanwijzingen dat de mate van TVX-verspreiding tijdens het koppen wordt beïnvloed door fysiologische omstandigheden en omgevingsfactoren zoals temperatuur, zon en wind. Bij vroeg koppen is het risico op virusverspreiding lager dan bij laat koppen; bij warm, zonnig of winderig weer is het risico op virusverspreiding lager dan wanneer er onder koelen en/of vochtige omstandigheden wordt gekopt.

Tijdens het machinaal koppen van (viruszieke) tulpen onder praktijkomstandigheden vindt er verspreiding van TVX via de kopmachine plaats. Echter, de omvang van de virusverspreiding is relatief laag en de uitsmering is gering. In de praktijk zal het risico op virusverspreiding bij 'diep koppen' niet groter of kleiner zijn dan bij 'normaal koppen'. Hierbij moet gemeld worden dat de weersomstandigheden tijdens het koppen zeer gunstig waren om virusverspreiding te beperken. Wanneer er bij minder gunstige omstandigheden wordt gekopt (bijv. op koele dagen met een hoge luchtvochtigheid), dan wordt verwacht dat het risico op virusverspreiding zal toenemen.

Betrokkenheid van verschillende mijtensoorten bij de verspreiding van TVX (PT project 12271)

Voor tulpengalmijt, bollenmijt en stromijt is hun betrokkenheid bij de overdracht van TVX onderzocht. Omdat dit onderdeel in het laatste jaar van project 12271 is toegevoegd is er beperkt onderzoek naar dit onderwerp uitgevoerd. De tulpengalmijt is inderdaad een vector voor TVX en verspreidt het virus redelijk efficiënt. Daarnaast is uit deze eenjarige analyse gebleken dat ook de stromijt een vector is van TVX, hoewel niet efficiënt. Omdat de stromijt in grote aantallen voor kan komen tijdens de bewaring en niet door Actellic bestreden wordt, wordt verwacht dat de stromijt ook een belangrijke bijdrage kan leveren aan de verspreiding van TVX.

Deze conclusies uit beide projecten hebben geleid tot verschillende aanbevelingen voor de praktijk om verdere verspreiding van TVX te beperken. De aanbevelingen richten zich onder andere op het gescheiden telen en bewaren van viruszieke partijen ten opzichte van gezonde partijen, het ziekzoeken en het vroegtijdig verwijderen van ziek plantmateriaal voor het kappen en voor het rooien van de bollen. Daarnaast wordt er geadviseerd om vooral niet te laat te kappen en vroegtijdig klepelen van het gewas te beperken. Voor aanvang van de bewaring moeten de opslagruimten schoon en stofvrij zijn. Tijdens het drogen en bewaren van de bollen moeten daarnaast stromijt en tulpengalmijt doelmatig bestreden worden en populaties mijten in de gaten gehouden worden.

1.2 Aanleiding van onderzoek

1.2.1 Onderzoek naar mijten als vector van TVX

In een éénjarige proef is in project 12271 aangetoond dat de tulpengalmijt inderdaad een vector is voor TVX en dat de tulpengalmijt het virus redelijk efficiënt verspreidt. Daarnaast is uit deze eenjarige analyse gebleken dat ook de stromijt een vector is van TVX, hoewel niet efficiënt. Omdat de stromijt in grote aantallen voor kan komen tijdens de bewaring en niet door Actellic bestreden wordt, is het de vraag of de stromijt ook een belangrijke bijdrage kan leveren aan de verspreiding van TVX. Via meerjarige experimenten moet dus aangetoond worden dat de stromijt betrokken is bij TVX-verspreiding.

1.2.2 TVX waardplantenonderzoek en verspreiding via de grond

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 bijna identiek aan het TVX-virus dat in Nederland in tulp voorkomt. Op basis van deze resultaten is het vermoeden ontstaan dat

- a. TVX mogelijk een bredere waardplantenreeks heeft dan alleen tulp
- b. TVX via een bodemgebonden vector is overgebracht naar de vangplanten.

De mogelijkheid dat TVX kan voortbestaan in andere gewassen dan alleen tulp en mogelijk ook een bodemgebonden verspreidingsroute kent, is niet eerder onderzocht. Daarentegen hebben keurmeesters van de Bloembollenkeuringsdienst (BKD) afgelopen jaar PPO-BBF enkele malen geïnformeerd over het pleksgewijs optreden van TVX symptomen in een tulpenveld. Deze lokale symptomen worden in het algemeen in relatie gebracht met schimmeloverdraagbare virussen (bijv. Augustaziek (tabaksnecrosevirus) door *Olpidium*) of nematode overdraagbare virussen (tabaksratelvirus door *Paratrichodorus* spp. en *Trichodorus* spp. en nepovirussen en tobnavirussen door *Xiphinema* spp. en *Longidorus* spp.). Echter, de waargenomen pleksgewijze symptomen waren typisch voor TVX. ELISA-analyses bevestigden de aanwezigheid van TVX.

Daarnaast is het onduidelijk of TVX-besmette plantenresten een infectiebron kunnen vormen voor infectie met TVX tijdens de teelt op het veld.

Om verdere verspreiding van TVX te voorkomen is het van belang alle verspreidingsroutes en mogelijke infectiebronnen van TVX te kennen. Dit geeft telers de mogelijkheid om selectiever percelen te selecteren voor de teelt van virusvrije tulpen.

1.2.3 TVX verspreiding via water

Uit recent onderzoek naar Hosta Virus X (een vergelijkbaar virus als TVX) is gebleken dat het spoelen van Hosta planten een groot risico geeft voor verspreiding van het virus. Het is momenteel onbekend of TVX-verspreiding plaatsvindt tijdens het spoelen van bollen. Tevens is het onbekend of er tijdens de waterbroei virusverspreiding via water plaatsvindt. Juist bij waterbroei ontstaan er wondjes door het plaatsen van bollen op de prikbakken van waaruit virus via het water kan worden verspreid en besmetting in naastgelegen bollen kan veroorzaken.

1.3 Dit onderzoek

Dit project doet onderzoek naar verspreidingsroutes voor TVX tijdens teelt, bewaring en broei. De volgende onderwerpen worden in dit rapport beschreven:

1. Onderzoek naar waardplantenreeks van TVX (Hoofdstuk 3).
2. Onderzoek naar de risico's van TVX-verspreiding tijdens het spoelen van bollen (Hoofdstuk 4).
3. Onderzoek naar de risico's van TVX-verspreiding tijdens machinaal pellen van bollen (Hoofdstuk 4).
4. Onderzoek naar de risico's van TVX-verspreiding tijdens waterbroei (Hoofdstuk 5).
5. Onderzoek naar de rol van tulpengalmijt, stromijt en bollenmijt als vector van TVX tijdens de bewaring van tulpenbollen (Hoofdstuk 6).
6. Onderzoek naar de rol van virusvectoren zoals *Olpidium* spp., *Paratrichodorus* spp. en *Trichodorus* spp. betrokken bij de bodemgebonden verspreiding van TVX (Hoofdstuk 7).

De verkregen kennis wordt aansluitend op dit onderzoek vertaald in een update van maatregelen waarmee infectie en verdere verspreiding van TVX te voorkomen is (Hoofdstuk 8).

2 Gebruikte methodes voor aantonen TVX

Tijdens het onderzoek is veelvuldig gebruik gemaakt van toetsmethodes om TVX in blad of bol aan te tonen. Bij elke onderdeel wordt aangegeven welke toetsmethode is gebruikt. In dit hoofdstuk worden de technische details van de toetsmethoden beschreven en de wijze van interpretatie van toetsresultaten.

2.1 Serologische detectie van TVX m.b.v. ELISA

Bladtoets TVX

Twee tot drie weken na de bloei van tulp werd er een bladmonster van de tulpenplant genomen (tweede blad). Volgens standaard werkwijze voor DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay) is de aanwezigheid van TVX bepaald. Deze analyses werden volgens vergelijkbare werkwijze bij PPO of BQ Support uitgevoerd. ELISA-waarden werden na 2 uur incubatie doorgemeten. ELISA-absorptiewaarden lager dan 0.15 werden als negatief beoordeeld. ELISA-waarden gelijk of hoger dan 0.15 werden als positief opgemerkt.

Boltoets TVX

Zes weken na het rooien van tulpenbollen werd er een bladschijfje van de buitenste twee rokken van een bol afgesneden voor analyse. Volgens standaard werkwijze voor DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay) is de aanwezigheid van TVX bepaald. Deze analyses werden volgens standaard werkwijze bij PPO uitgevoerd. Om het risico op *sample-to-sample carry over* (kruisbesmetting van de rollerpers tussen monsters) te minimaliseren, werd de rollerpers tussen individuele monsters grondig afgeborsteld en gereinigd. ELISA-waarden werden na 2 uur incubatie doorgemeten. ELISA-absorptiewaarden lager dan 0.15 werden als negatief beoordeeld. ELISA-waarden gelijk of hoger dan 0.15 werden als positief beoordeeld.

2.2 Moleculaire detectie van TVX m.b.v. PCR

PCR-toets

Voor RNA-extractie werd per plant 0.1 gram plantmateriaal bemonsterd. RNA-extractie vond plaats met behulp van de Plant Magnetic Extraction kit van AGOWA en het Kingfisher extractieplatform voor semi-geautomatiseerde extractie. cDNA-synthese vond plaats met behulp van de RT-enzym reagentia van Promega volgens meegeleverde instructies. Als cDNA primer werd gebruik gemaakt van primer TVXRev (5'-ccc acc aga ctt tca ctg gt-3'). PCR detectie van TVX werd uitgevoerd met 2x Mastermix reagentia van Promega volgens meegeleverde instructies. Als primers voor PCR werden gebruikt: TVXFor (5'-acg cca agc tta tct gga ac -3') en TVXRev (5'-ccc acc aga ctt tca ctg gt-3'). Aanwezigheid van een PCR-amplicon (453 bp) werd zichtbaar gemaakt met agarose-gelelectroforese.

TaqMAN PCR-toets

Voor RNA-extractie werd per plant 0.1 gram plantmateriaal bemonsterd. RNA-extractie vond plaats met behulp van de Plant Magnetic Extraction kit van AGOWA en het Kingfisher extractieplatform voor semi-geautomatiseerde extractie. cDNA-synthese vond plaats met behulp van de RT-enzym reagentia van Promega volgens meegeleverde instructies. Als cDNA primer werd gebruik gemaakt van primer TVXdetRev (5'-ggc tcc atc ttg tga ctg gt-3'). TaqMAN PCR detectie van TVX werd uitgevoerd op een Stratagene MX3000p met 2x Mastermix reagentia van Promega volgens meegeleverde instructies. Als primer en probe voor PCR werden gebruikt: TVXdetFor (5'-aag cgg cag tca tgc tct at-3'), TVXdetRev (5'-ggc tcc atc ttg tga ctg gt-3') en TVXProbe (5'-ata cat gcg gag gta cag gg-3').

Aanwezigheid van een PCR-amplicon werd gebaseerd op basis van de Ct-waarde. ELISA-waarden gelijk of hoger dan 35 cycli werden als negatief beoordeeld. ELISA-absorptiewaarden lager dan 35 werden als negatief beoordeeld.

2.3 Statistische analyse besmettingspercentages

De mate van infectie met TVX tijdens de teelt is bepaald m.b.v. ELISA-toetsen. De mate van infectie wordt weergegeven als percentage (%) besmetting. Of er tijdens een risicovolle handeling een significante toename aan TVX-infectie heeft plaatsgevonden, wordt berekend met de 'z-toets': een statistische toetsmethode om te bepalen of twee onafhankelijke steekproeven significant van elkaar verschillen. Als betrouwbaarheidsinterval werd 95% gehanteerd ($p=0.05$). De berekening van de z-toets werd uitgevoerd met behulp van de internetapplicatie van In-Silico Online (<http://in-silico.net/statistics/ztest/two-proportion>).

3 Waardplantenonderzoek TVX

3.1 Literatuuronderzoek

De identificatie van TVX in vangplanten geteeld op grond van een oude boomgaard deed het vermoeden ontstaan dat TVX mogelijk een bredere waardplantenreeks heeft dan alleen tulp. Tevens deed deze resultaten vermoeden dat TVX via een bodemgebonden vector is overgebracht naar de vangplanten. Uit een literatuurstudie bleek dat Mowat in 1982 uitgebreid onderzoek heeft gedaan naar de waardplantenreeks van TVX (Tabel 1). Deze reeks waardplantenreeks is uitgebreid met recentere literatuur van Tzanetikas et al (2005) en Dees (2011). Sinds 2010 zijn er ook enkele incidenten bekend van een TVX infectie in lelie.

Tabel 1. Waardplantenreeks voor TVX op basis van experimentele inoculatie.

	Latijnse naam	Nederlandse naam
1	<i>Anthriscus cerefolium</i>	Moeskruid, tamme kervel
2	<i>Apium graveolens</i>	Selderij
3	<i>Beta vulgaris</i>	Snijbiet
4	<i>Chenopodium album</i> ¹	Melganzenvoet
5	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Ganzevoet
6	<i>Chenopodium quinoa</i>	Gierstmelde
7	<i>Coriandrum sativum</i>	Koriander
8	<i>Cryptotaenia japonica</i>	Japanse Peterselie
9	<i>Cucumis sativus</i>	Komkommer
10	<i>Daucus carota</i>	Wortel
11	<i>Gomphrena globosa</i>	Kogelamaranth
12	<i>Helichrysum bracteatum</i>	Strobloem
13	<i>Heracleum sphondylium</i>	Berenklauw
14	<i>Lactuca sativa</i>	Sla
15	<i>Lilium</i>	Lelie
16	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomaat
17	<i>Melissa officinalis</i>	Citroen melisse
18	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Nicotiana benthamiana
19	<i>Petroselinum crispum</i>	Peterselie
20	<i>Plox drumondii</i>	Vlambloem
21	<i>Scandix pecten-veneris</i>	Naaldenkervel
22	<i>Spinacia oleracea</i>	Spinazie
23	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	Nieuwzeelandse spinazie
24	<i>Trifolium incarnatum</i>	Inkarnaatklaver
25	<i>Tulipa</i>	Tulp
26	<i>Urtica urens</i> ¹	Kleine brandnetel
27	<i>Viola odorata</i>	Maarts viooltje
28	<i>Viola tricolor</i>	Driekleurig viooltje

¹ Aangetoond in dit onderzoek, niet eerder beschreven in literatuur.

3.2 Onkruidanalyse op tulpenpercelen

Tijdens dit project zijn diverse praktijkpercelen getraceerd waar partijen tulp met TVX-infecties werden geteeld. Op deze percelen zijn onkruiden bemonsterd die in de nabijheid van TVX-geïnfecteerde tulpenplanten groeiden: akkerleeuwklauw, bladrammanas, ereprijs, herderstasje, melganzenvoet, kiek, klaver, klein kruiskruid, paarse dovenetel, perzikkruid, tarwe, varkensgras, vogelwikke, wikke en zwaluwtong.

Een gedeelte van deze onkruiden zijn opgenomen in de lijst van bekende waardplanten voor TVX, een aantal andere onkruiden komen frequent voor tijdens de teelt van tulp en zijn niet eerder door Mowat (1982), Tzanetikas et al (2005) en/of Dees et al (2011) bestudeerd. De bemonsterde onkruiden zijn met een TVX-ELISA getoetst op aanwezigheid van TVX. Hierbij moet worden opgemerkt dat op de bezochte locaties het onkruidbeheer effectief was waardoor er weinig onkruid groeide. Daarom zijn per locatie, per onkruid een beperkt aantal planten zijn getoetst.

Met deze serologische analyse voor TVX kon alleen bij melganzevoet (*Chenopodium album*) TVX worden aangetoond. Bij geen van de andere onkruiden werd TVX m.b.v. ELISA aangetoond. De aanwezigheid van TVX in melganzevoet is aansluitend met een PCR-toets voor TVX bevestigd. Als laatste is de DNA-sequentie bepaald van het TVX PCR-product uit melganzevoet. De verkregen sequentie kwam overeen met de sequentie van TVX die in Nederland voorkomt (www.q-bank.eu).

Aansluitend op de nateelt van tulpen uit onderzoek naar TVX-overdracht door mijten (§6.4) is in de kas bewust spontane onkruidgroei in de kas gestimuleerd. De grond werd vochtig gehouden. Na enkele weken groeide er vogelmuur (*Stellaria media*) en kleine brandnetel (*Urtica urens*) in de kas. Monsters van beide type onkruiden zijn met TaqMAN PCR en reguliere PCR geanalyseerd op aanwezigheid van TVX. Beide toetsen bevestigden de aanwezigheid van TVX in kleine brandnetel. Als extra bewijs dat TVX in spontaan opgekomen brandnetel kan voorkomen, is de sequentie van het PCR-product bepaald. De sequentie bevestigde de aanwezigheid van TVX zoals dat ook in tulp voorkomt.

3.3 Discussie en conclusies

De lijst van waardplanten uit Tabel 1 toont aan dat TVX zeker geen virus is dat alleen in tulp voor kan komen. Met name onkruiden als *Chenopodium album* (melganzenvoet), *Trifolium incarnatum* (klaver), *Viola* species (wilde viooltjes) en *Urtica urens* (kleine brandnetel) zijn frequent voorkomende akkeronkruiden die tijdens de teelt ook tussen het tulpengewas aanwezig kunnen zijn wanneer de onkruidbeheersing onvoldoende is.

De veldscreening van TVX in vele soorten onkruid liet zien dat TVX in *Chenopodium album* voorkwam. In de overige soorten wilde planten werd TVX niet aangetoond. Dit enigszins beperkte resultaat toont daarentegen wel aan dat TVX tijdens de Nederlandse tulpenteelt in een onkruid/wilde plant voor kan komen.

Het gegeven dat TVX in Nederland ook in andere gewassen dan tulp kan voorkomen suggereert lokale verspreiding van plant tot plant. Zeer waarschijnlijk is hier een biologische vector bij betrokken. Het feit dat de brandnetels die aansluitend op de teelt van tulp zijn opgekomen ook besmet waren met TVX, geeft zelfs aan dat de verspreiding van plant tot plant *over teelten heen* kan plaatsvinden. In §6.4 en §7.4 wordt verder ingegaan op dit onderwerp.

Risico's voor nieuwe TVX infecties in tulp zijn er wanneer er daadwerkelijk virusoverdracht van een TVX-geïnfecteerde tulp naar dit type onkruiden kan plaats vinden en vice versa. Het TVX-geïnfecteerde onkruid dient dan als virusreservoir. De resultaten uit dit onderzoek tonen aan dat er virusreservoirs voor TVX in wilde planten/onkruiden aanwezig kunnen zijn. Uitgebreide praktijkmonitoring is nodig om de omvang van deze reservoirs te bepalen.

A



B



Figuur 1. Melganzenvoet (*Chenopodium album*) en kleine brandnetel (*Urtica urens*) zijn waardplant voor TVX. Tijdens en na de teelt van TVX-geïnfekteerde tulp is TVX in deze plantensoorten aangetroffen.

4 Risico's op TVX-verspreiding tijdens verwerken, spoelen en pellen

4.1 Introductie

Uit recent onderzoek naar Hosta Virus X (een vergelijkbaar virus als TVX) is gebleken dat het spoelen van Hosta planten een groot risico geeft voor verspreiding van het virus (PT project 12051). Daarnaast is het een algemene stelregel dat potexvirussen, dus ook TVX, via mechanische beschadiging kunnen verspreiden. Tijdens het verwerken en pellen van bollen, rollen de bollen veelvuldig langs elkaar heen of vallen bollen op andere bollen. Ook kan er versmering van virus op de pelmachine plaatsvinden. De volgende vraagstellingen zijn onderzocht:

1. Vindt er verspreiding van TVX plaats (is er een toename in %TVX binnen een partij) wanneer droge bollen van een TVX-geïnfecteerde partij gedurende een periode langs elkaar worden gerold.
2. Vindt er verspreiding van TVX plaats (is er een toename van %TVX binnen en tussen partijen) wanneer bollen gewassen/gespoeld worden met water en gedurende een periode langs elkaar worden gerold.
3. Vindt er verspreiding van TVX plaats (is er een toename van TVX binnen en tussen partijen wanneer bollen mechanisch gepeld worden).

4.2 Materiaal en methode

Gebruikte tulpenpartijen en viruspercentage op basis van boltoets voorafgaand aan experiment:

- | | | |
|---------------------|---------|------------------------------------|
| - cv. Alli Baba | 0% TVX | machinaal geroid, handmatig gepeld |
| - cv. Gordon Cooper | 7% TVX | machinaal geroid, handmatig gepeld |
| - cv. Pink Diamond | 65% TVX | machinaal geroid, handmatig gepeld |
| - cv. Blue Herron | 79% TVX | machinaal geroid, handmatig gepeld |
| | | |
| - cv. Inzell | 0% TVX | machinaal geroid, ongepeld |
| - cv. La Courtine | 44% TVX | handmatig geroid, ongepeld |

Voor de rol- en spoelproeven is gebruik gemaakt van een cementmolen waarin de bollen droog, of in aanwezigheid van een klein volume water gedurende 5 minuten zijn rondgedraaid (Figuur 2ab). Voor de pelproef is gebruik gemaakt van een Van Dijke pelmachine (Figuur 2cd).

Uitvoering rol- en spoelproeven

<i>Behandeling en werkvolgorde</i>	<i>Uitvoering</i>
A. Verspreiding door rollen binnen partij	3 series van 150 bollen cv Gordon Cooper (7% TVX) zijn na elkaar gedurende 5 minuten (droog) langs elkaar gerold. Er was een beetje zand (50ml) aanwezig om de bollen licht te schuren. 3x150 bollen zijn opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
B. Verspreiding tijdens spoelen binnen partij	3 series van 150 bollen cv. Gordon Cooper (7% TVX) zijn gedurende 5 minuten (nat) langs elkaar gerold. Het water werd tussentijds niet vervangen. Er was een beetje zand aanwezig om de bollen licht te schuren. 3x150 bollen zijn

	opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
C. Verspreiding tijdens spoelen binnen partij	1 serie van 150 bollen cv. Blue Herron (79% TVX) werd gedurende 5 minuten (nat) langs elkaar gerold. Het water werd tussentijds <u>niet</u> vervangen. Er was een beetje zand aanwezig om de bollen licht te schuren. De 150 bollen zijn opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
D. Verspreiding tijdens spoelen tussen partij cv. Alli Baba	3 series van 150 bollen cv. Alli Baba werden gedurende 5 minuten (nat) langs elkaar gerold. Het water werd tussentijds niet vervangen. Er was een beetje zand aanwezig om de bollen licht te schuren. 3x150 bollen zijn opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
E. Besmetten van het water met TVX	1 serie van 150 bollen cv. Blue Herron (79% TVX) werd gedurende 5 minuten (nat) langs elkaar gerold. Het water werd tussentijds niet vervangen. Er was een beetje zand aanwezig om de bollen licht te schuren. De 150 bollen zijn opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
F. Verspreiding tijdens spoelen binnen/tussen partij cv. Pink Diamond	3 series van 150 bollen cv Pink Diamond (65%) werden gedurende 5 minuten (nat) langs elkaar gerold. Het water werd tussentijds niet vervangen. Er was een beetje zand aanwezig om de bollen licht te schuren. 3x150 bollen zijn opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
Na het spoelen zijn de bollen gedurende een uurtje in gaasbakken in de open lucht gedroogd. Aansluitend zijn de bollen in gaasbakken in de bewaarcel geplaatst. Na 24 uur zijn de gedroogde bollen in gaasnetten verzameld.	
G. Controle opplant cv Gordon Cooper	3 series van 100 bollen van cv. Gordon Cooper die verder geen behandelingen hebben gehad, zijn als controle opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
H. Controle opplant cv Pink Diamond	2 series van 100 bollen van cv. Pink Diamond die verder geen behandelingen hebben gehad, zijn als controle opgeplant voor TVX analyse aan het blad.

Uitvoering mechanische pelproeven

<i>Behandeling en werkvolgorde</i>	<i>Uitvoering</i>
I. Verspreiding tijdens mechanisch pellen binnen partij	± 4000 bollen cv La Courtine (44% TVX) werden machinaal gepeld (Van Dijke pelmachine). Van deze serie werden 200 planten opgeplant voor TVX analyse aan blad. Er werd verwacht dat de pelmachine na deze partij voldoende besmet zou zijn met TVX.
J. Verspreiding tijdens mechanisch pellen tussen partijen	± 800 bollen van cv Inzell (0%TVX) zijn aansluitend mechanisch gepeld. Vijf series van ± 180 bollen zijn achtereenvolgens apart opgevangen en als losse series opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
K. Controle opplant cv La Courtine	1 serie van 200 bollen van cv La Courtine die handmatig zijn gepeld, zijn als controle opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
L. Controle opplant cv Inzell	1 serie van 200 bollen van cv Inzell die handmatig zijn gepeld, zijn als controle opgeplant voor TVX analyse aan het blad.
Normaal gesproken worden bollen eerst nat gemaakt voor ze over de pelmachine gaan. Deze bollen die in dit experiment werden gebruikt, waren droog. Echter, boven de rollers worden de bollen automatisch iets nat gespoten. Dit is omdat de rollers zo beter schoon gehouden kunnen worden. De mechanisch gepelde bollen zijn daarom een dag bij 24°C weggelegd om te drogen. Aansluitend zijn ze nog ze nog handmatig nagepeld.	

a.



b.



c.



d.



Figuur 2. Foto's gemaakt tijdens rol, spoel en pel-experimenten; a) onderzoek naar verspreiding door (droog) rollen binnen partij, b) onderzoek naar verspreiding tijdens spoelen , c,d) onderzoek naar verspreiding tijdens mechanisch pellen.

4.3 Resultaten en discussie

In Tabel 2 is het verloop van TVX-percentages weergegeven bij onderzoek naar mechanische tijdens verwerken, spoelen en pellen.

Verspreiding door rollen

Tijdens het rollen van (gepelde) bollen vindt er geen virustoename plaats (Onderzoeksonderdeel A). Het percentage TVX na de behandeling is bij alle drie de herhalingen vergelijkbaar met het percentage TVX voor de behandeling.

Verspreiding tijdens spoelen

Tijdens het spoelen van een partij (Onderzoeksonderdeel B) is bij één van de drie herhalingen een viruspercentage waargenomen dat significant verschilt t.o.v. het percentage TVX voorafgaand aan de behandeling; 7% TVX is toegenomen tot 12.7% TVX. De percentages TVX van de andere twee herhalingen (5.1 en 10.7% TVX) zijn statistisch gelijk aan het percentage TVX voorafgaand aan de behandeling (7% TVX). Daarentegen verschillen de viruspercentages niet t.o.v. de controle-opplant van cv. Gordon Cooper (Onderzoeksonderdeel G). Op basis van deze resultaten zijn er daarom geen aanwijzingen gevonden voor verspreiding van TVX tijdens het spoelen binnen een partij Gordon Cooper met 7% TVX.

Een virustoename werd niet waargenomen bij cv. Blue Herron (Onderzoeksonderdeel C en E). Bij deze behandeling was de opkomst vanwege een tulpengalmijntinfectie in de tulpenbollen zeer laag. Daarnaast waren de bollen van deze partij al voor 80% geïnfecteerd voor het spoelen. Een kleine toename in virus is bij dergelijk beginpercentage niet zichtbaar. Helaas was cv. Pink Diamond ook zwaar aangetast door tulpengalmijt dat ook bij deze cultivar onvoldoende opkomst was voor betrouwbare vergelijking van viruspercentages (Onderzoeksonderdeel F).

Belangrijkste doel van het spoelen van cv. Blue Herron was het besmetten van het water met TVX voor onderzoek naar virusverspreiding tussen partijen (Onderzoeksonderdeel D). Bij de virusvrij aangeplante cv. Ali Baba werd bij één van de drie herhalingen 1% TVX waargenomen. Statistisch gezien is dit geen significante toename. Echter, deze partij is niet meer virusvrij waardoor er toch geconcludeerd kan worden dat er tijdens het spoelen een zeer geringe verspreiding van TVX kan plaatsvinden. In dit geval gaat het om TVX-verspreiding tussen partijen, van cv. Blue Herron naar cv. Ali Baba. Ondanks dat verspreiding van TVX tijdens het spoelen niet is waargenomen bij cv. Gordon Cooper en cv. Blue Herron, is het de verwachting dat dergelijke geringe verspreiding van TVX ook binnen partijen tijdens het spoelen kan optreden. Deze verspreiding is te gering om op een betrouwbare wijze aan te tonen bij een partij bollen die reeds geïnfecteerd is met TVX.

Verspreiding tijdens mechanisch pellen

De pelmachine is eerst op natuurlijke wijze besmet met TVX door een partij cv. La Courtine met TVX mechanisch pellen. Op basis van de boltoets voor pellen werd een besmettingspercentage van 44% gevonden. Het percentage virus van de mechanisch en handmatig gepelde bollen was exact gelijk aan elkaar, 40.5% TVX op basis van de bladtoets. Het verschil in viruspercentage tussen de boltoets en bladtoets kan verklaard worden door het effect van een steekproef en mogelijk kleine verschillen in gevoeligheid van bladtoets ten opzichte van boltoets.

Na het mechanisch pellen van de TVX-partij cv. La Courtine is een partij cv. Inzell mechanisch gepeld. Series van ±175 bollen zijn in volgorde van verwerking in aparte gaasbakken opgevangen en apart opgeplant. Bij de eerste serie bollen die van de pelmachine is afgekomen, is een zeer lichte toename in virus waargenomen, 1 van de 168 opgeplante bollen bleek TVX-besmet te zijn. Dit is geen significante toename, maar deze serie is niet meer vrij van TVX. De 4 series bollen die aansluitend na de eerste partij van 168 bollen van de pelmachine zijn gekomen, bleven vrij van TVX. Net als bij het spoelen van bollen kan er bij het mechanisch pellen tussen partijen een zeer geringe verspreiding van TVX optreden. Deze verspreiding is te gering om op een betrouwbare wijze aan te tonen bij een partij bollen die reeds geïnfecteerd is met TVX.

Tabel 2. Percentage TVX naar aanleiding van onderzoek naar de risico's op TVX-verspreiding tijdens rollen van bollen, spoelen van pollens en mechanisch pellen. Het percentage TVX is voorafgaand aan de behandeling aan de bol bepaald. Na de risicovolle behandeling is een nateelt uitgevoerd en is het percentage TVX aan het blad bepaald.

Onderzoeksonderdeel	Cultivar (%TVX voor behandeling)	%TVX na behandeling
A. Verspreiding binnen partij door rollen	Gorden Cooper 7% (n=100)	6.7% (n=75) 6.7% (n=90) 9.0% (n=89)
B. Verspreiding binnen partij tijdens spoelen	Gorden Cooper 7% (n=100)	5.1% (n=78) 10.7% (n=84) 12.7% (n=102)
C. Verspreiding binnen partij tijdens spoelen	Blue Herron 79% (n=100)	80.0% (n=20) ¹
D. Verspreiding tussen partijen tijdens spoelen	Alli Baba 0% (n=100)	0.0% (n=102) 0.0% (n=89) 1.0% (n=100) ⁴
E. Besmetten van het water met TVX	Blue Herron 79% (n=100)	77.8% (n=18) ¹
F. Verspreiding tijdens spoelen binnen/tussen partij	Pink Diamond 65% (n=100)	73.3% (n=15) ² 45.5% (n=11) ² 33.3% (n=21) ²
G. Controle opplant cv Gordon Cooper	Gordon Cooper 7% (n=100)	11.7% (n=103) 11.7% (n=103) 6.7% (n=104)
H. Controle opplant cv Pink Diamond	Pink Diamond 65% (n=100)	54.6% (n=88) 59.6% (n=99)
I. Verspreiding binnen partij tijdens mechanisch pellen	La Courtine 44% (n=100)	40.5% (n=200)
J. Verspreiding tussen partijen tijdens mechanisch pellen	Inzell 0% (n=100)	0.6% (n=168) ^{3,4} 0.0% (n=193) 0.0% (n=197) 0.0% (n=186) 0.0% (n=179)
K. Controle opplant cv La Courtine	La Courtine 44% (n=100)	40.5% (n=200)
L. Controle opplant cv Inzell	Inzell 0% (n=100)	0.0% (n=200)

¹ Zeer slechte opkomst vanwege zware tulpengalmijntinfectie
² Zeer slechte opkomst vanwege onbekende oorzaak
³ In volgorde van opvangen na het mechanisch pellen
⁴ Geen significante toename, maar partij is niet meer virusvrij

4.4 Conclusie

Zowel bij het spoelen van tulpenbollen als bij het mechanisch pellen kan er verspreiding van TVX optreden. De mate van verspreiding was in dit onderzoek erg gericht; slechts een enkele bol van een virusvrije partij raakte tijdens spoelen en mechanisch pellen geïnfecteerd met TVX. In een partij waarin een besmetting met TVX aanwezig is, zal de geringe TVX toename als gevolg van mechanische verspreiding nauwelijks waarneembaar zijn. Daarentegen kunnen virusvrije partijen geïnfecteerd raken wanneer deze aansluitend op een TVX-partij verwerkt worden. Zodra er een lichte besmetting met TVX in een partij aanwezig is, kan in de loop van de teeltseizoenen het percentage in de partij toenemen en alsnog voor kwaliteitsproblemen zorgen.

5 Risico's tijdens waterbroei

5.1 Introductie

Broei van tulpenbloemen vindt steeds vaker plaats door middel van waterbroei. Tulpenbollen worden op zogenaamde prikbakken geprikt waarna de bak met water en/of voedingsmedium wordt gevuld. Enerzijds raken bollen beschadigd tijdens het prikken op de bak. Anderzijds komt het wondweefsel kort na het prikken onder water te staan waardoor virus mogelijk via het water van bol tot bol kan verspreiden. Het is onbekend of, en in welke mate er TVX-verspreiding tijdens waterbroei kan optreden. Mocht er serieuze verspreiding van TVX optreden, dan kan dit mogelijk tijdens de broei al tot visuele schade leiden.

5.2 Materiaal en methode

Bij het onderzoek naar de risico's van TVX verspreiding tijdens de waterbroei is gebruik gemaakt van diverse partijen tulp:

Cultivar	% TVX
Ben van Zanten	0%
Gordon Cooper	7%
Pink Diamond	65%
Blue Herron	79%

Cultivar Ben van Zanten werd gebruikt als virusvrije partij. Cultivars Blue Herron, Pink Diamond en Gordon Cooper waren drie verschillende partijen die als TVX bron zijn gebruikt.

Prikbakken zijn gebruikt waarin per bak 108 bollen zijn geplant (9 rijen van 12 bollen). Het teeltschema voor het onderzoek naar virusverspreiding tijdens de broei is beschreven in Tabel 3. Als controle zijn 2 bakken waterbroei zonder extra virusbron ingezet (tray 1 en 2). Voor onderzoek naar verspreiding van TVX zijn drie verschillende TVX-virusbronnen gebruikt. Voor cv. Gordon Cooper zijn 2 bakken waterbroei ingezet (tray 3 en 4), voor Pink Diamond en Blue Herron zijn ieder vier bakken waterbroei ingezet (tray 5-8 en 9-12). Bij alle drie de combinaties zijn per bak 3 rijen van 9 planten van de TVX-bron aangeplant. Vanwege de verschillende percentages TVX in de verschillende cultivars, was de virusdruk per combinatie anders:

Gordon Cooper (7%)	van de $3 \times 9 = 27$ planten zijn gemiddeld 2 planten per bak besmet met TVX
Pink Diamond (65%)	van de $3 \times 9 = 27$ planten zijn gemiddeld 18 planten per bak besmet met TVX
Blue Herron (79%)	van de $3 \times 9 = 27$ planten zijn gemiddeld 21 planten per bak besmet met TVX.

Op de overige 81 plekken in een prikbak zijn beplant met cv. Ben van Zanten. De waterbroei is in het voorjaar van 2010 uitgevoerd.

Aansluitend op de bloei is tijdens waterbroei per serie aan één prikbak onderzocht of eventuele virusverspreiding al meetbaar was. Hiertoe zijn per serie 81 blaadjes van cv. Ben van Zanten bemonsterd en getoetst op aanwezigheid van TVX. Tevens zijn bollen aansluitend op de waterbroei geoogst en onder de juiste klimaatomstandigheden bewaard zodat nateelt mogelijk was. Tijdens de nateelt in 2011 is het percentage TVX aan het blad bepaald.

Tabel 3. Teeltschema's voor onderzoek naar overdracht van TVX tijdens waterbroei. Per teeltschema zijn 2 of 4 trays ingezet.

Legende													<table><tr><th>Cultivar</th><th>Virus status</th><th>Kleur</th></tr><tr><td>Ben van Zanten</td><td>Gezond</td><td></td></tr><tr><td>Gordon cooper</td><td>7% TVX</td><td></td></tr><tr><td>Pink diamond</td><td>60% TVX</td><td></td></tr><tr><td>Blue Heron</td><td>79% TVX</td><td></td></tr></table>			Cultivar	Virus status	Kleur	Ben van Zanten	Gezond		Gordon cooper	7% TVX		Pink diamond	60% TVX		Blue Heron	79% TVX																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Cultivar	Virus status	Kleur																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Ben van Zanten	Gezond																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Gordon cooper	7% TVX																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Pink diamond	60% TVX																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Blue Heron	79% TVX																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Controle-opplant virusvrij: Tray 1 & 2																TVX-verspreiding #1: Tray 3 & 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
<table><tr><td></td><td colspan="12">Kolom</td></tr><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr><tr><td>rij 1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																	Kolom													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	rij 1													rij 2													rij 3													rij 4													rij 5													rij 6													rij 7													rij 8													rij 9													<table><tr><td></td><td colspan="12">Kolom</td></tr><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr><tr><td>rij 1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																	Kolom													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	rij 1													rij 2													rij 3													rij 4													rij 5													rij 6													rij 7													rij 8													rij 9												
	Kolom																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
rij 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	Kolom																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
rij 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
TVX-Verspreiding #2: Tray 5, 6, 7 & 8																TVX-verspreiding #3: Tray 9, 10, 11 & 12																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
<table><tr><td></td><td colspan="12">Kolom</td></tr><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr><tr><td>rij 1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																	Kolom													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	rij 1													rij 2													rij 3													rij 4													rij 5													rij 6													rij 7													rij 8													rij 9													<table><tr><td></td><td colspan="12">Kolom</td></tr><tr><td></td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr><tr><td>rij 1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>rij 9</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																	Kolom													1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	rij 1													rij 2													rij 3													rij 4													rij 5													rij 6													rij 7													rij 8													rij 9												
	Kolom																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
rij 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	Kolom																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
rij 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
rij 9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													

5.3 Resultaten en discussie

Waterbroei op prikbakken is uitgevoerd met een virusvrije partij Ben van Zanten. Het risico op verspreiding van TVX is bestudeerd door dezelfde prikbakken tulpen te broeien die besmet waren met TVX (tray 3 t/m12). De hoeveelheid TVX-tulpen per prikbak varieerde van gemiddeld 2 TVX-planten per prikbak met in totaal 108 tulpen (tray 3,4) tot 18 respectievelijk 21 TVX-tulpen per prikbak met 108 tulpen (tray 5, 6, 7 en 8, respectievelijk tray 9, 10, 11 en 12).

Virusanalyse aan het blad aan het einde van de waterbroei bleek nog niet informatief te zijn (alleen tray 1, 3, 5 en 9 zijn aan blad getoetst). In geen van de onderzochte tulpen van cv. Ben van Zanten werd een virusinfectie waargenomen (Tabel 4). De tijdens de waterbroei nieuw gevormde bolletjes zijn aansluitend op de waterbroei geoogst en onder de juiste temperatuursomstandigheden bewaard om nateelt op het veld mogelijk te maken. De bewaring is vrij van tulpengalmijt geweest.

Aansluitend op de bloei tijdens de nateelt is opnieuw het viruspercentage bepaald. De tulpen die zonder TVX-bron gebroeid zijn, zijn virusvrij gebleven (Tabel 4). Daarentegen werd tijdens de nateelt wel virus aangetroffen in de tulpen die in aanwezigheid van TVX-tulpen gebroeid zijn. De waargenomen percentages TVX waren laag en statistisch niet verschillend ten opzichte van 0% (op basis van Z-toets, $p=0.05$). Toch tonen deze resultaten aan dat de virusvrij-geplante tulpen tijdens de waterbroei geïnfecteerd zijn geraakt met TVX. De virustoename is te laag om een effect te zien van de virusdruk tijdens de waterbroei.

Tabel 4. Percentages TVX in Ben van Zanten aansluitend op waterbroei in aanwezigheid van een TVX-bron.

Virusbron	Tray	Percentage TVX in Ben van Zanten		
		Tijdens broei 2010 (bladtoets)	Tijdens nateelt 2011 (bladtoets)	
			Per tray	Gemiddeld
Geen	1	0% (n=108)	0% (n=72)	0% (n=172)
	2		0% (n=100)	
Gordon Cooper (~2 planten per bak besmet met TVX)	3	0% (n=81)	1.8% (n=57)	1.3% (n=157)
	4		1.0% (n=100)	
Pink Diamond (~18 planten per bak besmet met TVX)	5	0% (n=81)	0.0% (n=54)	0.6% (n=331)
	6		0.0% (n=94)	
	7		0.0% (n=106)	
	8		2.6% (n=77)	
Blue Herron (~21 planten per bak besmet met TVX)	9	0% (n=81)	0.0% (n=39)	1.4% (n=364)
	10		1.0% (n=116)	
	11		3.0% (n=100)	
	12		0.9% (n=109)	

Het is onbekend of de daadwerkelijke virusverspreiding al optrad kort na het plaatsen van de bollen in de prikbak en het aansluitend vullen van de bak met water (dus wanneer er recente verwondingen zijn aangebracht), of dat de verspreiding van TVX pas plaats vond tijdens de groeifase van de bollen.

In dit onderzoek heeft waterbroei plaatsgevonden in prikbakken met stilstaand water. Verspreiding van TVX beperkte zich daarmee tot tulpen die in dezelfde prikbak werden gebroeid. Bij gebruik van een eb- en vloedsysteem is het te verwachten dat het virus via het eb- en vloedsysteem ook in andere prikbakken (eventueel met een ander cultivar) terecht kan komen en dan mogelijk ook in andere bakken tot virusinfecties kan leiden. In dit onderzoek was de virustoename binnen een prikbak echter gering. Het risico op virusinfecties tussen bakken via een eb- en vloedsysteem wordt daarom als klein beschouwd.

Tijdens de broei van de tulpen zijn bij cv. Ben van Zanten geen visuele virussymptomen waargenomen. Ook tijdens de bladtoets tijdens de broei werd geen virus aangetroffen terwijl in tray 3 één van de 54 planten besmet was geraakt met TVX. Blijkbaar was de virusconcentratie tijdens de bladbemonstering tijdens de broei nog te laag voor een betrouwbare detectie van een recente infectie met TVX.

Deze resultaten geven aan dat wanneer er tijdens waterbroei verspreiding en infectie van TVX plaatsvindt, deze virusinfecties tijdens de waterbroei niet direct tot virussymptomen leiden en de kwaliteit van de gebroeide tulpen niet negatief beïnvloed wordt.

Mocht er tijdens de waterbroei verspreiding van TVX optreedt, dan is dat tijdens de broei zelf nog niet zichtbaar. Wil men de afgebroeide bollen doortelen, dan moet men er alert op zijn dat men een dergelijke partij niet voorafgaand aan het planten al mengt met virusvrije bollen van eenzelfde cultivar. Er wordt geadviseerd om een nateeltpartij eerst een jaar als aparte partij te telen zodat men tijdens de nateelt inzicht kan krijgen in de virusstatus. Op basis van verkregen virusinformatie kan aansluitend besloten worden een dergelijke nateeltpartij alsnog toe te voegen aan andere partijen van hetzelfde cultivar.

5.4 Conclusie

Bij aanwezigheid van TVX-geïnfecteerde tulpen kan er tijdens waterbroei virusverspreiding optreden waardoor het percentage TVX in een partij stijgt. De waargenomen virustoename is echter wel gering en blijft beperkt tot 0.5-1.5%.

6 Virusoverdracht door mijten

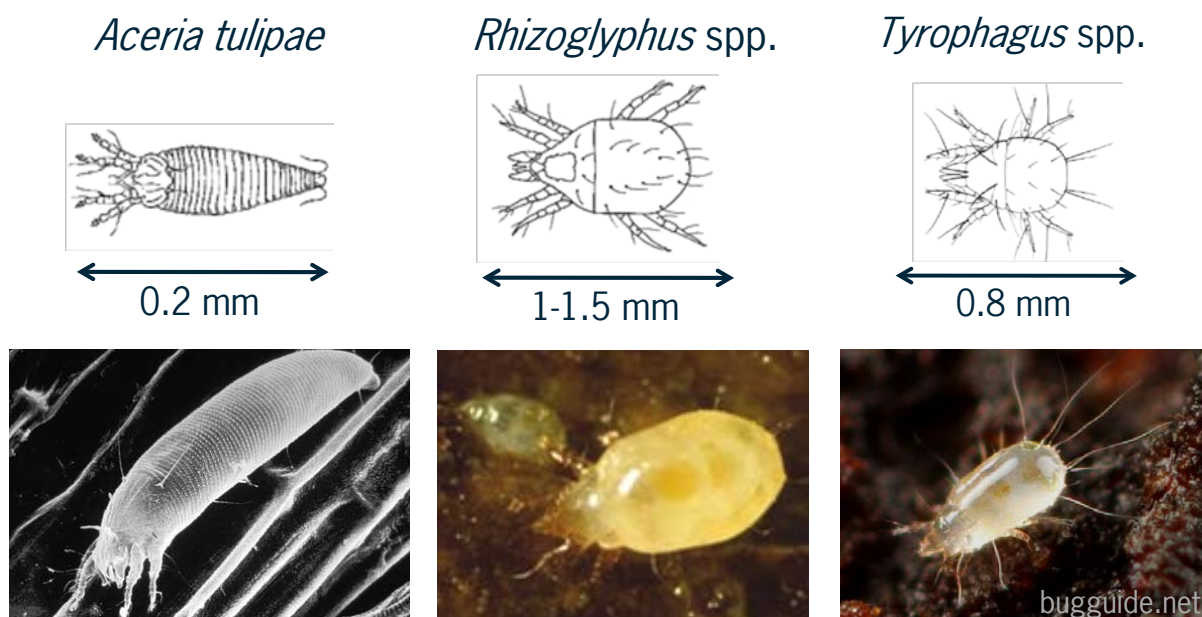
6.1 Algemene introductie

TVX behoort tot de familie van Potex-virussen, waarvan bekend is dat ze op mechanische wijze worden verspreid. In praktijk werd echter waargenomen dat TVX vaak voorkwam in partijen waarin ook een infectie met tulpengalmijt (*Aceria tulipae*) zat. Zo ontstond het vermoeden dat TVX ook overgedragen kan worden door tulpengalmijt (Asjes, 1998). De mijt zou het virus dan waarschijnlijk in de bewaring verspreiden, omdat het bekend is dat deze mijt zich tijdens de warme bewaring juist explosief vermeerdert en zich tussen de bollen verspreidt.

De familie van galmijten (Eriophyidae) staat inderdaad bekend als vector van virussen, maar niet van dit type virus. De tulpengalmijt is wel een vector van andere virussen in ui en knoflook (Van Dijk et al., 1991; Yamashita et al., 1996; Kang et al. 2007).

Er zijn echter ook nog andere mijten die in de bewaring van tulpenbollen voorkomen. Dit zijn mijten van de familie *Rhizoglyphus* (beter bekend als 'bollenmijten') en van de familie *Tyrophagus* (ook wel 'stromijten'). Beide families behoren tot de groep Acaridae mijten, waarvan niet bekend is dat ze virussen kunnen overbrengen. De afgelopen jaren heeft onderzoek van PPO (PT project 12948: Mijt en tripsbestrijding m.b.v. een mijtval) en in de praktijk (persoonlijke communicatie JanWillem van der Meer van Van Gent Van der Meer Nuyens B.V, 2011) aangetoond dat stromijten heel frequent en in grote aantallen in bollenschuren voorkomen. Bollenmijten en stromijten worden niet goed bestreden met een ruimtebehandeling met pirimifosmethyl (werkzame stof van het product Actellic-50), die standaard wordt toegepast voor tulpengalmijt. Er is zelfs resistentie tegen pirimifos-methyl gevonden in deze groepen mijten (Stables, 1984; Kuwahara, 1986). Ook onderzoek van PPO (PT-project 14121: kernrot in tulp, verslag in de maak) bevestigt dit weer. Vanuit praktijk kwam de vraag te onderzoeken of bollenmijten en stromijten ook een vector kunnen zijn van TVX.

In dit hoofdstuk geven we een overzicht van het onderzoek dat in het recente verleden is uitgevoerd naar verspreiding van TVX door verschillende soorten mijten (§6.2). Die kennis is namelijk niet altijd uitgebreid beschreven. Daarnaast rapporteren we over het vervolgonderzoek dat binnen dit PT-project is uitgevoerd (§6.3 en §6.4). Figuur 3 laat de mijtensoorten zien waar in dit onderzoek mee is gewerkt.



Figuur 3. Tulpengalmijt (*Aceria tulipae*), bollenmijt (*Rhizoglyphus*) en stromijt (*Tyrophagus*). Afmetingen zijn bij benadering en gelden voor volwassen individuen.

6.2 TVX overdracht in de bewaring 2007

6.2.1 Introductie

Dit onderzoek viel onder PT project 12271 (PPO project 32 340 075 00) en werd uitgevoerd in 2007. In deze proef werd de verspreiding van TVX door verschillende soorten mijten in de bewaring onderzocht. Hiervoor werd een opstelling gebruikt van verticale plastic buizen waarin de bollen werden gestapeld.

6.2.2 Materiaal en methoden

Mijten van *Rhizoglyphus echinopus* en van *Tyrophagus* werden verzameld van tulpen en werden in het laboratorium op granen respectievelijk gist gekweekt. Een populatie van tulpengalmijt werd gehouden op de cultivar Yokohama. In alle laboratoriumpopulaties was de geselecteerde mijtensoort dominant, maar de aanwezigheid van andere soorten kan niet worden uitgesloten.

De cultivars Pink Diamond en Renown werden gebruikt voor het overdrachtsexperiment. Tijdens de broei werd van elke plant de aanwezigheid van TVX getest door een bladmonster te analyseren met een TVX-ELISA. ELISA werd uitgevoerd via de standaard procedure (Clark en Adams 1977). De afgebroeiende bollen werden vervolgens gebruikt in het experiment. Hoewel geen mijten op deze bollen werden waargenomen en de bollen geen symptomen van aantasting met mijten vertoonden, kan natuurlijke infectie met mijten niet volledig worden uitgesloten. Begin september werden tien bollen waarin TVX was aangetoond, geïnoculeerd met een van de drie mijtensoorten. De controlebehandeling werd niet geïnoculeerd. Elke behandeling werd vier keer herhaald en elke herhaling werd in een gesloten plastic zak bij 20°C bewaard om de mijtenpopulaties te laten groeien. Na tien dagen werden de geïnoculeerde bollen overgebracht in een buis. In deze buizen werden 25 TVX-vrije bollen van cv. Renown en 25 TVX-vrije bollen van cv. Pink Diamond toegevoegd om overdracht van TVX te bestuderen. De buizen werden bewaard bij 20°C en zonder elkaar te raken, om kruisbesmetting van andere mijtensoorten te voorkomen. Omdat weinig mijten werden waargenomen in de bollen die waren geïnoculeerd met *R. echinopus* of *Tyrophagus*, werden deze opnieuw geïnoculeerd met de betreffende mijtensoort. Aan het einde van de bewaring in november werden alle bollen buiten geplant. In mei 2008 werd elke opgekomen plant getest op de aanwezigheid van TVX met behulp van bladmonsters op de eerder beschreven wijze. Vanwege de lage aantallen bollen met TVX-infectie, kunnen de resultaten niet statistisch worden geanalyseerd.

6.2.3 Resultaten

Aantallen geplante bollen, opgekomen planten en TVX-positieve planten staan in

Tabel 5, per cultivar opgeteld voor elke behandeling. Veel geplante bollen kwamen niet op door infectie met *Penicillium*. Er werd geen overdracht van TVX waargenomen in de controles en in de bollen die met *R. echinopus* waren geïnfecteerd. TVX werd wel waargenomen in zes bollen die waren besmet met tulpengalmijt (in twee van de vier herhalingen) en in twee bollen die waren besmet met stromijten (in twee van de vier herhalingen).

6.2.4 Conclusies & discussie

- TVX kan in de bewaring worden verspreid.
- Mijten lijken verantwoordelijk voor deze wijze van verspreiding, met name tulpengalmijt maar mogelijk ook stromijt. Omdat natuurlijke infecties met mijten niet volledig waren uit te sluiten, is echter niet precies te zeggen welke soorten mijten het virus in deze proef hebben overgedragen.
- Meer details over deze proef staan beschreven in Lommen et al. (in druk, Engelstalig).

Tabel 5. Overdracht van TVX in bollen van twee cultivars na infectie met verschillende soorten mijten. R=Renown, PD=Pink Diamond.

behandeling	cultivar	aantal bollen geplant	aantal planten opgekomen en getest op TVX	aantal planten TVX-positief
controle	R	100	23	0
	PD	100	5	0
tulpengalmijt	R	100	22	5
	PD	100	11	1
<i>R. echinopus</i> (een bollenmijt)	R	100	28	0
	PD	100	31	0
<i>Tyrophagus</i> spp. (stromijten)	R	100	70	2
	PD	100	69	0

6.3 TVX overdracht in het laboratorium 2009

6.3.1 Introductie

Dit onderzoek viel onder het huidige PT project 13630 (PPO project 32 340 751 00). In dit onderzoek werd transport en transmissie van TVX door de verschillende mijtensoorten verder onderzocht. Om ongewenste aanwezigheid van natuurlijke infecties met mijten in de bollen uit te sluiten, maakten we gebruik van gekweekte mijten, individuele bollen en bolpartjes. Bovendien werd het transmissie-experiment uitgevoerd in het laboratorium.

6.3.2 Materiaal en methoden

Er werden nieuwe mijtenkweken opgezet. De soorten *R. echinopus* en *T. putrescentiae* werden geïsoleerd uit bollen van het cultivar Flaming Parrot en in het laboratorium op een dieet van gist gehouden. De identiteit van de mijten werd door twee onafhankelijke externe deskundigen bevestigd met behulp van morfologie. Daarnaast werd intern een DNA-analyse uitgevoerd op het ITS2-gedeelte van het ribosomale DNA, wat specifiek is voor soorten binnen de familie Acaridae (Noge et al., 2005; Yang et al., 2011).

Twee TVX-geïnfecteerde cultivars werden als virusbron gebruikt: Pink Diamond (65% van de bollen met TVX) en Blue Herron (79% van de bollen met TVX). Omdat Blue Herron ook last had van tulpengalmijt, werd deze partij behandeld met Actellic-50, waardoor de mijten succesvol werden gedood.

Om te onderzoeken of mijten virusdeeltjes kunnen transporteren, voerden we een moleculaire analyse uit op mijten die in de gelegenheid waren gesteld zich te voeden op TVX-geïnfecteerde bollen. Concreet werden alle soorten mijten 10 dagen op TVX-geïnfecteerd bollenweefsel gezet. Daarna werden per mijtensoort 15 mijten geanalyseerd met TVX-specifieke PCR.

Dezelfde populaties van mijten werden daarna gebruikt om te onderzoeken of mijten virusdeeltjes van geïnfecteerde bollen kunnen overbrengen naar gezonde bollen. In november en december sneden we bollen van een gezonde partij Ben van Zanten (0% TVX) aan, zodat de toegang voor mijten werd vergemakkelijkt. Elke bol werd individueel in een bekertje geplaatst. Aan elk bekertje voegden we een van de mijtensoorten toe op de volgende wijze. De mijten hadden al tenminste twee dagen op TVX-geïnfecteerde bollen gezeten. Mijten van *R. echinopus* en *T. putrescentiae* zaten op stukjes bollenweefsel. Per bekertje voegden we drie stukjes weefsel met mijten toe (met elk 10-15 mijten erop). We zorgden ervoor dat deze stukjes niet in aanraking kwamen met het snijvlak om mechanische transmissie te voorkomen (Figuur 4). Ter controle voegden we stukjes weefsel zonder mijten toe. Tulpengalmijten werden individueel van TVX-geïnfecteerde bollen gevist en overgezet op het snijvlak van de gezonde bollen (cv. Ben van Zanten, 5-10 mijten per bekertje). Nadat de laatste mijten waren overgezet, werden de bollen op reguliere wijze opgeslagen. Daarbij werden bollen die waren geïnfecteerd met dezelfde soort mijten, bij elkaar bewaard om uitdroging te voorkomen. Twee weken later werden de bollen buiten geplant. Als extra controle werden 100 onbehandelde bollen van cv. Ben van Zanten uit de bewaring op hetzelfde veld geplant. In mei 2010 testte we elke opgekomen plant op de aanwezigheid van TVX met behulp van een bladtoets (zoals eerder beschreven). De aantallen geplante bollen staan in tabel 2. Vanwege het lage aantal bollen van cv. Ben van Zanten dat geïnfecteerd raakte kon geen statistische analyse worden uitgevoerd.

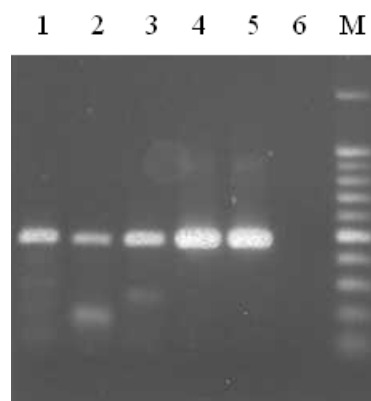


Figuur 4. Opzet van het transmissie-experiment. Boven: mijten (niet zichtbaar) kunnen zich voeden op TVX-zieke bolpartjes. Onder: partjes bollen met mijten toegevoegd aan een TVX-vrije bol.

6.3.3 Resultaten

De nucleotidesequentie van de ITS2 van het nucleaire ribosomaal DNA van *T. putrescentiae* geïsoleerd van tulpenbollen werd succesvol bepaald en is gedeponeerd in Genbank (HQ681248 en HQ681249). Vergelijkende sequentie analyse van de verkregen ITS2 sequenties door BLAST liet een 82-100% sequentie homologie zien met sequenties van andere exemplaren van *T. putrescentiae* (Yang et al., 2011; en niet gepubliceerde resultaten) en een 85-86% sequentie homologie met *T. neiswanderi* (Noge et al., 2005).

Nadat de mijten hadden gevoed op TVX-geïnfecteerd bollenweefsel, werd TVX aangetroffen in alle soorten mijten: tulpengalmijt, *R. echinopus* en *T. putrescentiae* (Figuur 5).



Figuur 5. TVX-specifieke PCR-producten uit monsters van mijten afkomstig van TVX-geïnfecteerd bollenweefsel. 1=*R. echinopus*; 2= *T. putrescentiae*; 3=tulpengalmijt; 4-5= TVX-geïnfecteerd bollenweefsel (positieve controle); 6=water (negatieve controle); M= 100bp ladder.

Tabel 6 geeft de resultaten van het transmissie-experiment. Niet alle bollen kwamen op. In de opgekomen planten werd slechts één TVX-positief bevonden. Deze was afkomstig van de behandeling met *R. echinopus*.

Tabel 6. Transmissie van TVX in individuele bollen na infectie met verschillende soorten mijten onder laboratoriumomstandigheden.

behandeling	aantal bollen geplant	aantal planten opgekomen en getest op TVX	aantal planten TVX-positief
controle	10	8	0
tulpengalmijt	7	6	0
<i>R. echinopus</i> (een bollenmijt)	55	41	1
<i>T. putrescentiae</i> (een stromijt)	56	52	0

6.3.4 Conclusies & discussie

- TVX werd aangetoond in monsters van tulpengalmijt, *R. echinopus* en *T. putrescentiae* nadat deze mijten op TVX-ziek bollenweefsel hadden gevoed. Waarschijnlijk blijven virusdeeltjes aan de mijten 'plakken' wanneer zij met beschadigd weefsel (door aansnijden in de proef of door vreten van de mijten) in aanraking komen en transporteren zij op deze wijze virusdeeltjes.
- *R. echinopus* is mogelijk ook een vector van TVX. Het moet worden uitgezocht of verspreiding door deze potentiële vector in praktijkomstandigheden ook plaatsvindt.
- Overdracht door tulpengalmijt is in deze proef niet gelukt doordat de tulpengalmijt na de verplaatsing naar de gezonde bol snel zijn doodgegaan. De omstandigheden in het experiment waren waarschijnlijk niet optimaal voor deze soort.
- Meer details over deze proef staan beschreven in Lommen et al. (in druk, Engelstalig).

6.4 TVX overdracht in de bewaring 2010

6.4.1 Introductie

Bovenstaande proeven lieten zien dat zowel tulpengalmijt als *R. echinopus* (een bollenmijt) en *T. putrescentiae* (een stromijt) het virus TVX bij zich kunnen dragen nadat ze op TVX-zieke tulpenbollen waren gezet. Ook gaven de resultaten sterke aanwijzingen dat mijten inderdaad in staat zijn TVX naar gezonde bollen over te brengen. De experimenten lieten echter niet zien welke soorten mijten in de bewaring daadwerkelijk TVX overbrengen. Daarom voerden we nogmaals experimenten uit met partijen tulpen in de bewaring. Omdat tulpengalmijt zich makkelijk verspreidt, werden aparte proeven uitgevoerd voor tulpengalmijt enerzijds, en bollen-en stromijt anderzijds. In de proef met bollen-en stromijt maakten we dit keer gebruik van mijten uit zuivere laboratoriumkweken.

6.4.2 Materiaal en methoden

Meerdere partijen tulpen werden na oogst in 2010 gecontroleerd op de aanwezigheid van TVX (met behulp van een boltoets aan 100 bollen in juli) en mijten (visuele inspectie en extractie met behulp van Berlese-trechters in augustus). Alle partijen bleken tenminste één van de soorten mijten bij zich te dragen en er was geen partij zonder stromijten. De partijen die voor de proeven werden gekozen, staan in Tabel 7.

Tabel 7. Partijen gebruikt in de proeven in de bewaring van 2010.

cultivar	klasse	TVX	mijten van nature in partij			functie
			tulpengalmijt	bollenmijt	stromijt	
Menton	Japan	0%	-	-	+	gezonde testpartij*
La Courtine	n.v.t.	44%	-	+	+	TVX-bron
Yellow Flight	n.v.t.	niet getest	+	+	+	tulpengalmijt-bron
* bleek tijdens experiment ook besmet te zijn met tulpengalmijt						

Tot aanvang van de proeven werden de partijen onder reguliere condities bewaard in grote bewaarcellen. Yellow Flight stond vanwege zijn galmijtinfectie in een andere cel dan de andere twee partijen. Hieronder staat per proef de experimentele opzet uitgewerkt.

Gedurende de experimenten bleek echter dat Menton onverwachts besmet was met tulpengalmijt. Zodoende zaten er in alle behandelingen onbedoeld galmijtinfecties. Hiermee is rekening gehouden bij de uitwerking van de gegevens.

6.4.3 Proef TVX overdracht na infectie met tulpengalmijt

In deze proef was het doel om de overdracht van TVX door tulpengalmijt in de bewaring nader te bestuderen bij verschillende ruimtelijke verdelingen van de partijen met en zonder virus. Dat zou inzicht geven in het risico op virusverspreiding binnen een bewaarcel.

In oktober 2010 zijn bollen van Menton (de TVX-vrije testpartij) op verschillende wijzen gecombineerd met verschillende aantallen bollen van La Courtine (de TVX-bron) en/of Yellow Flight (de tulpengalmijtbron). Mentons werden ofwel volledig gemengd in een zakje met de andere bollen (behandeling 2-4) of onder de andere bollen in hetzelfde zakje gelegd (behandeling 5) of onder de andere bollen in een gaasbak gelegd (behandeling 6) (zie ook schema in §0). Er werden vier herhalingen uitgevoerd voor elke behandeling. Alle zakjes werden opgehangen in een aparte bewaarcel zonder andere zakjes te raken en met een barrière van vaseline om overlopen van mijten tussen behandelingen te voorkomen. Er heerste een constante temperatuur van 20°C tot half december, toen de temperatuur conform praktijkomstandigheden werd verlaagd tot 5°C.

Tabel 8. Aantallen bollen per partij per behandeling in de proef met tulpengalmijt. Voor details zie §0.

partij	functie	aantal bollen per herhaling in behandeling:					
		1	2	3	4	5	6
Menton	gezonde testpartij*	40	60	80	40	40	40
La Courtine	TVX-bron		40		40	40	40
Yellow Flight	tulpengalmijt-bron			20	20	20	20
totaal		40	100	100	100	100	100

* bleek tijdens experiment ook besmet te zijn met tulpengalmijt

Na bewaring werden alle partijen uit de zakjes weer van elkaar gescheiden en per partij in een eigen bed opgeplant in een vollegrondskas in januari 2011 (opplantschema in §0). Bij het sorteren van de bollen voor het planten bleken veel bollen te zijn aangetast door *Penicillium*. Bij zware *Penicillium*-aantasting werd een bol niet geplant maar binnen een week op de aanwezigheid van TVX getoetst door middel van een ELISA boltoets.

In de kas waren jarenlang geen tulpen gekweekt. De temperatuur varieerde tussen 5 en 18 °C. Per herhaling werd het aantal opgekomen planten gescoord. Elke opgekomen plant werd vervolgens gescoord op bloemontwikkeling, de aanwezigheid van galmijt bloemsymptomen en na bloei getest op de aanwezigheid van TVX door middel van een ELISA bladtoets.

6.4.4 Proef TVX overdracht na infectie met bollenmijten en stromijten

In deze proef was het doel te onderzoeken of bollenmijten en stromijten ook in de bewaring TVX kunnen overbrengen.

Vooraf werd van elk cultivar een monster genomen en het aantal mijten dat daarin van nature aanwezig was, werd geteld. In oktober 2010 zijn voor elke herhaling 30 bollen van Menton in een pantykous gedaan samen met 30 bollen van de viruspartij La Courtine (behalve in de controlebehandeling). Voor de behandeling met bollenmijt werd de pure laboratoriumkweek van *Rhizoglyphus echinopus* gebruikt, voor stromijt de laboratoriumkweek van *Tyrophagus putrescentiae*. De mijten uit elke kweek werden elk apart gemengd met het vulmiddel vermiculiet om een zo homogeen mogelijke infectie te creëren. Een afgepaste hoeveelheid vermiculiet werd vervolgens aan de pantykousen toegediend, waarna deze in een gaaszakje werd opgehangen (Figuur 6).

Er werden veertien herhalingen uitgevoerd voor elke behandeling (Tabel 9). Alle zakjes werden opgehangen in een aparte bewaarcel zonder andere zakjes te raken en met een barrière van vaseline om overlopen van mijten tussen behandelingen te voorkomen (Figuur 6). Er heerste een constante temperatuur van 20°C tot half december, toen de temperatuur conform praktijkomstandigheden werd verlaagd tot 5°C.

Tabel 9. Aantallen bollen en herhalingen in proef met bollen- en stromijten.

behandeling	aantal bollen per herhaling		aantal herhalingen	
	La Courtine	Menton	mijtentelling	virustoets
1. controle	0	30	4	10
2. TVX	30	30	4	10
3. TVX+Rhizoglyphus	30	30	4	10
4. TVX+Tyrophagus	30	30	4	10



Figuur 6. Opzet van de proef. De mijteninfectie wordt aangebracht door een mijtenkweek in vermiculiet aan de bollen toe te voegen (links). Daarna worden de zakjes bollen opgehangen (rechts) in de bewaring. Elke proef werd in een eigen cel uitgevoerd om kruisbesmettingen van mijten te voorkomen.

Vier herhalingen werden gebruikt om de mijtenpopulatie tijdens de proef te kunnen monitoren. Na een maand in de bewaring werden twee zakjes van elke herhaling gebruikt voor een mijtentelling. Het aantal *Rhizoglyphus* en *Tyrophagus* werden geteld in de bollen van elk cultivar en in de vermiculiet. Na twee maanden werden twee andere zakjes gebruikt voor dezelfde procedure.

De overige tien herhalingen werden gebruikt voor een virustoets na opplanten in een vollegrondskas. Na bewaring werden de bollen in vollegrondskassen geplant in januari 2011. Bollen met een zware aantasting van *Penicillium* werden niet geplant. Elke herhaling werd apart opgeplant en binnen een herhaling werden de cultivars van elkaar gescheiden. Veel bollen bleken symptomen van tulpengalmijt te hebben. De bollen zonder galmijtsymptomen werden daarom uit elk zakje geselecteerd en op dezelfde wijze in een aparte kas opgeplant (zie §0). Daarna werd op vergelijkbare wijze als in de proef met tulpengalmijt van elke plant de opkomst, bloemontwikkeling, galmijt bloemsymptomen en TVX gescoord (Figuur 7).



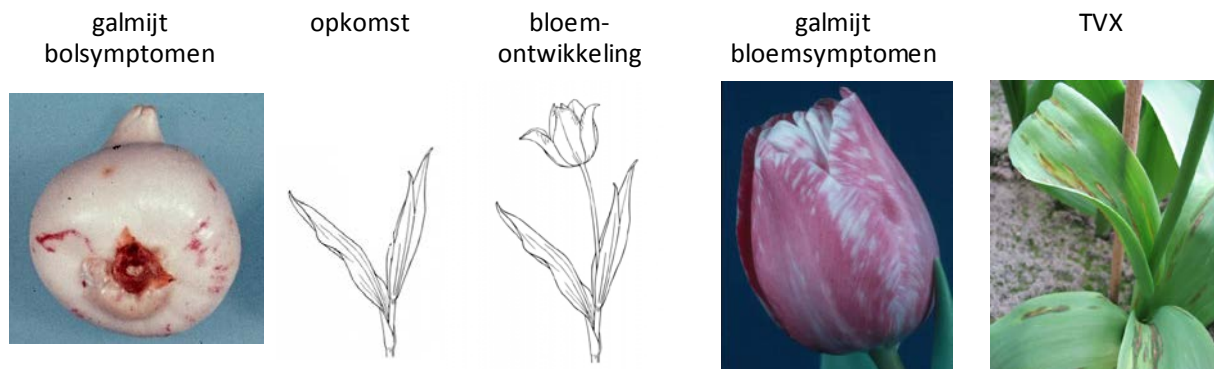
Figuur 7. Kas met de opplant van de proef “TVX overdracht na infectie met bollenmijten en stromijten”. Gescoorde bloemen zijn verwijderd. Medewerkers verzamelen bladmonsters voor de ELISA op TVX.

6.4.5 Verspreiding van TVX in de kas

In beide proeven 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 (meerdere tot tientallen procenten), terwijl een ander deel van de partij dat in andere proeven is gebruikt, geen virustoename liet zien maar op 44% was blijven steken. De combinatie van alle resultaten leidde tot het vermoeden dat virusoverdracht (ook) na de bewaring in de kas plaats had gevonden. Met deze verspreidingsroute was in de opzet van de proef geen rekening gehouden, omdat er vooraf geen duidelijke aanwijzingen voor deze route bestonden. Naar aanleiding van deze onverwachte resultaten is geïnventariseerd welke bodemgebonden vectoren in theorie betrokken zouden kunnen zijn geweest bij een dergelijke verspreidingsroute en voor zover dat nog mogelijk was is de aanwezigheid van deze vectoren in de kassen gecontroleerd.

6.4.6 Data-analyse

Bovenstaande proeven leverden gegevens op van duizenden individuele planten. Van elke plant werden meerdere eigenschappen gescoord die in de resultaten zullen worden gesymboliseerd door plaatjes (Figuur 8).



Figuur 8. Eigenschappen van de bollen die in de proeven zijn gemeten (zie materiaal en methoden voor details). De plaatjes worden in de resultaten gebruikt als symbool voor deze eigenschappen.

De data zijn apart geanalyseerd voor elk van de proeven en apart voor de cultivars La Courtine (viruszieke partij) en Menton (virusvrije partij). Data van Yellow Flight (galmijtbron) zijn niet geanalyseerd vanwege het kleine aantal bollen. Onderstaande statistische methoden zijn toegepast:

- Het significantie-niveau (α) is gesteld op 0.05 (dit betekent dat de kans dat een gevonden significant effect op toeval berust, kleiner is dan 5%).
- **Relatie tussen symptomen binnen één plant.** De relatie tussen verschillende symptomen (galmijt bolsymptomen, opkomst, galmijt bloemsymptomen, TVX) op individuele planten is getoetst met een chi-kwadraat toets. Hiervoor zijn de gegevens van alle opgekomen planten in de proeven gebruikt en samengevoegd (er is dus geen onderscheid gemaakt tussen verschillende behandelingen en herhalingen omdat het aantal bollen daarvoor te klein was).
- **Relatie tussen symptomen van twee cultivars binnen één herhaling.** De correlatie tussen de resultaten van de cultivars die samen in een zakje hebben gezeten is getoetst met een Spearman correlatie-toets.
- **Het effect van behandelingen.** Het effect van behandelingen op de gemeten variabelen (opkomst, galmijt bolsymptomen, galmijt bloemsymptomen, TVX) is getest met een Kruskal-Wallis. Wanneer er een algemeen effect werd gevonden, is vervolgens onderzocht welke behandelingen van elkaar verschilden. Hiertoe zijn paarsgewijze vergelijkingen gemaakt tussen alle combinaties van behandelingen met behulp van een Mann Whitney U. In de resultaten is het significantie-niveau (α) gecorrigeerd met een sequential Bonferroni voor het aantal paarsgewijze vergelijkingen dat is uitgevoerd.
- **Het effect van de aanwezigheid van de virusbron.** In de proef met tulpengalmijt bleek de virusvrije partij besmet met tulpengalmijt zodat in elke behandeling tulpengalmijt voorkwam. Daarom is een alternatieve analyse gemaakt van de resultaten waarbij de behandelingen zijn verdeeld in twee groepen: behandelingen waar de virusbron aanwezig was en behandelingen waar de virusbron afwezig was. Alleen de behandelingen waar alle bollen door elkaar in zakjes zaten, zijn gebruikt (behandeling 1-4). Het effect van de aanwezigheid van de virusbron op het percentage TVX is getest met een Mann Whitney U.
- **Het effect van plantbed.** In de proef met tulpengalmijt is elk cultivar in een apart plantbed geplant. De virusvrije partij was over twee bedden verdeeld vanwege het grote aantal bollen. Of het percentage TVX tussen de twee plantbedden verschild is getoetst met een Mann Whitney U.

6.4.7 Resultaten

6.4.7.1 Proef TVX overdracht na infectie met tulpengalmijt

Algemeen beeld van symptomen

Na bewaring hadden veel bollen een zware *Penicillium*-aantasting. Deze werden niet geplant maar met een boltoetst getest op de aanwezigheid van TVX. De percentages TVX waren nagenoeg gelijk aan de percentages van voor de bewaring.

Dit geeft aan dat TVX tijdens de bewaring zelf niet aantoonbaar toeneemt. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het feit dat de bollen in relatieve rust zijn en er niet voldoende vermenigvuldiging van TVX optreedt om in de toets boven de detectiegrens uit te kunnen komen. Het is onduidelijk hoe de ene geïnfecteerde bol van Menton geïnfecteerd heeft kunnen raken.

Over het algemeen is de opkomst erg laag. Dit wordt waarschijnlijk verklaard door de zware infectie met tulpengalmijt. Mogelijk is een deel van de bollen niet opgekomen door infectie met *Penicillium*. De bladtoets voor TVX laat zien dat TVX is toegenomen in alle cultivars (in La Courtine van 41% naar 88%, in Menton van 1% naar 59%, in Yellow Flight van 0% naar 9%).

Nagenoeg alle bollen hadden symptomen van tulpengalmijt op de bol. Daarom zijn de individuele bollen niet meer gescoord op de aanwezigheid van deze symptomen op de bol. Minder dan de helft van alle bloemen had echter galmijt bloemssymptomen. Het percentage galmijt bloemssymptomen en TVX is het laagste in Yellow Flight. Dat heeft waarschijnlijk te maken met de lage plantkwaliteit, waardoor er überhaupt weinig is opgekomen.

Tabel 10. Samenvatting aantallen bollen van de virustoets in elke fase van het onderzoek en per gemeten eigenschap.

periode	bollen	La Courtine (44% TVX na oogst)		Menton (0% TVX na oogst)		Yellow Flight (0% TVX na oogst)	
		aantal	%	aantal	%	aantal	%
bewaring	bewaard	640		1200		320	
einde bewaring	gebruikt voor virus boltoets	80	12.5	136	11.3	152	47.5
	TVX-positief (boltoets)	33	41.3	1	0.7	0	0.0
	geplant	555	86.7	1006	83.8	168	52.5
na opkomst	opgekomen	366	65.9	662	65.8	80	47.6
	met bloem	277	75.7	521	78.7	69	86.3
	met galmijt bloemssymptomen	85	30.7	288	55.3	3	4.3
	TVX-positief (bladtoets)	321	87.7	391	59.1	7	8.8

Relatie tussen symptomen binnen één plant.

Er was geen significante relatie tussen het voorkomen van galmijt bloemssymptomen en TVX.

Relatie tussen symptomen van twee cultivars binnen één herhaling.

Er was geen significante relatie tussen de twee cultivars Menton en La Courtine binnen één zakje wat betreft opkomst, galmijt bloemssymptomen of TVX.

Het effect van behandelingen.

Er was enorm veel variatie tussen herhalingen van behandelingen. Er was geen significant effect van de behandelingen op opkomst of TVX. Er was wel een significant effect op bloemssymptomen maar de effecten waren zo complex dat deze niet duidelijk te verklaren zijn.

Het effect van de aanwezigheid van de virusbron.

Er was geen significant verschil in TVX tussen behandelingen waar de virusbron aanwezig of afwezig was. Dit suggereert dat verspreiding niet (alleen) in de bewaring heeft plaatsgevonden.

Het effect van plantbed.

Er was geen significant verschil in percentage TVX tussen de twee plantbedden van Menton. Dit suggereert dat verspreiding in de kas tussen plantbedden kan optreden, want als verspreiding alleen over kleine afstand had plaatsgevonden was meer TVX verwacht in het bed van Menton dat direct naast La Courtine was geplant.

6.4.7.2 Proef TVX overdracht na infectie met bollenmijten en stromijten

Infectie met Rhizoglyphus en Tyrophagus mijten

Tabel 11 geeft een indruk van de aantallen acaride mijten die in de proef voorkwamen (dit zijn de *Rhizoglyphus* en *Tyrophagus* mijten). Bij aanvang van de proef hadden beide cultivars van nature een lichte infectie van zowel *Rhizoglyphus* als *Tyrophagus*. De tabel laat zien dat de hoeveelheid toegevoegde mijten in de daartoe aangewezen behandelingen echter vele malen groter waren. Na een maand is te zien dat de mijteninfectie daadwerkelijk is geslaagd: de hoeveelheid mijten is toegenomen in die behandelingen waar ze aan waren toegevoegd terwijl er nauwelijks nog mijten in de vermiculiet zitten. Na twee maanden is dit effect nog steeds zichtbaar voor de infectie met *Rhizoglyphus* maar niet voor *Tyrophagus* omdat inmiddels alle behandelingen grote aantallen *Tyrophagus* hebben geaccumuleerd.

Tabel 11. Geschatte aantallen mijten in de bollen en vermiculiet, op basis van twee herhalingen.

datum	behandeling	geschat aantal mijten per herhaling			
		<i>Rhizoglyphus</i> in de		<i>Tyrophagus</i> in de	
		bollen	vermiculiet	bollen	vermiculiet
nulmeting (okt)	natuurlijke besmetting Menton	1-20		50-100	
	natuurlijke besmetting La Courtine	1-20		1-20	
	vermiculiet voor controle		0		0
	vermiculiet voor TVX		0		0
	vermiculiet voor TVX + <i>Rhizoglyphus</i>		50-100		0
	vermiculiet voor TVX + <i>Tyrophagus</i>		0		>1000
na 1 maand (nov)	controle	0		1-20	
	TVX	0		1-20	
	TVX + <i>Rhizoglyphus</i>	100-500	1-20	1-20	0
	TVX + <i>Tyrophagus</i>	0	0	100-500	1-20
na 2 maanden (dec)	controle	0		100-500	
	TVX	1-20		100-500	
	TVX + <i>Rhizoglyphus</i>	100-500	0	50-100	0
	TVX + <i>Tyrophagus</i>	1-20	0	50-100	0

Algemeen beeld van symptomen

Tabel 12 geeft een samenvatting van de resultaten van de bollen die in zijn gebruikt voor de virustoets. Het valt op dat beide cultivars een grote toename van TVX laten zien: tien procent bij de toch al viruszieke partij La Courtine (van 44 naar 53.9%) en bijna veertig procent bij de virusvrije partij Menton (van 0 naar 39.1%). Deze percentages toename in TVX sluiten aan bij de incidenten die af en toe in de praktijk worden waargenomen en zijn vele malen groter dan de enkele procenten die doorgaans door de jaren heen in de praktijk worden gevonden. Figuur 9 geeft een beeld van de visuele symptomen op het blad en op de bloem.

Tabel 12. Samenvatting aantallen bollen van de virustoets in elke fase van het onderzoek en per gemeten eigenschap.

periode	bollen	La Courtine (44% TVX na oogst)		Menton (0% TVX na oogst)	
		aantal	%	aantal	%
bewaring	bewaard voor virustoets	900		1200	
einde bewaring	geplant	880	97.8	1153	96.1
	met galmijt bolsymptomen	774	88.0	1109	96.2
na opkomst	opgekomen	627	71.3	855	74.2
	met bloem	422	67.3	517	60.5
	met galmijt bloemsymptomen	140	33.2	287	55.5
	TVX-positief (bladtoets)	338	53.9	334	39.1



Figuur 9. Visuele symptomen van TVX op het blad: van lichtere plekkjes (linksboven en midden) tot necrotische plekken (rechtsboven) en visuele symptomen op de bloem: donkere streepjes op het bloemblad (rechtsonder) die ontbreken op bloemen van gezonde planten (linksonder).

Daarnaast valt op dat beide cultivars zwaar zijn besmet met tulpengalmijt: slechts een kleine minderheid heeft geen symptomen van galmijt op de bol. Zoals in de materiaal en methoden staat, is het cultivar Menton waarschijnlijk de bron. Deze cultivar kan een infectie van tulpengalmijt bij zich hebben gedragen of het in de bewaring voor aanvang van de proef hebben opgelopen. Wanneer dit laatste het geval is, dan kunnen deze galmijten vanwege het ontbreken van een TVX-partij in deze bewaar ruimte geen TVX hebben geïntroduceerd.

De opkomst is bij beide cultivars met krap driekwart van de bollen erg laag. Het gewas stond er ook zeer ongelijk bij. Dit wordt waarschijnlijk grotendeels verklaard door deze zware infectie van tulpengalmijt. Daarnaast kunnen plantenpathogenen een oorzaak van zijn, de schimmel *Penicillium* werd voor het planten meerdere malen aangetroffen.

Het percentage bloemen dat galmijtsymptomen laat zien is maar half zo groot als het percentage bollen met bolsymptomen. Er zat ook veel variatie in de mate van bloemsymptomen (Figuur 10).

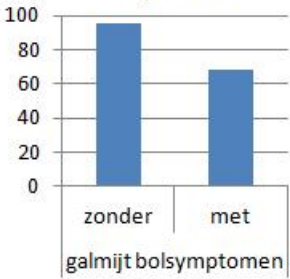
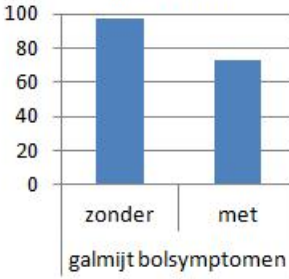
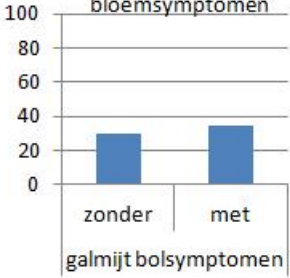
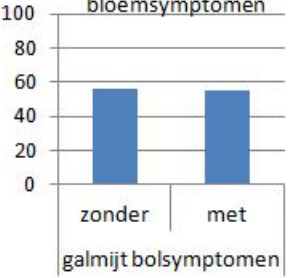
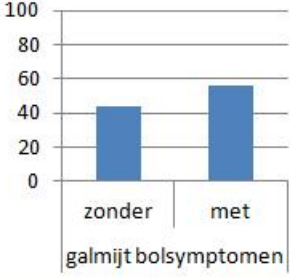
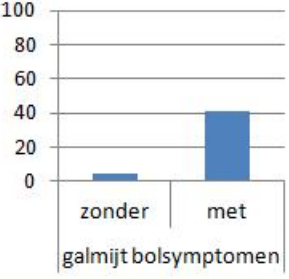
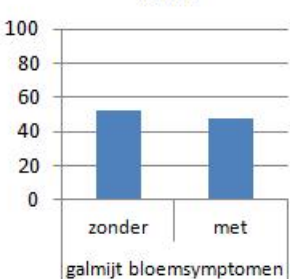
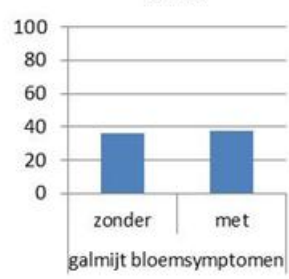


Figuur 10. Variatie in galmijt bloemsymptomen (de witte, ovale plekjes in de bloemblaadjes) binnen één partij van elk van de cultivars.

Relatie tussen symptomen binnen één plant

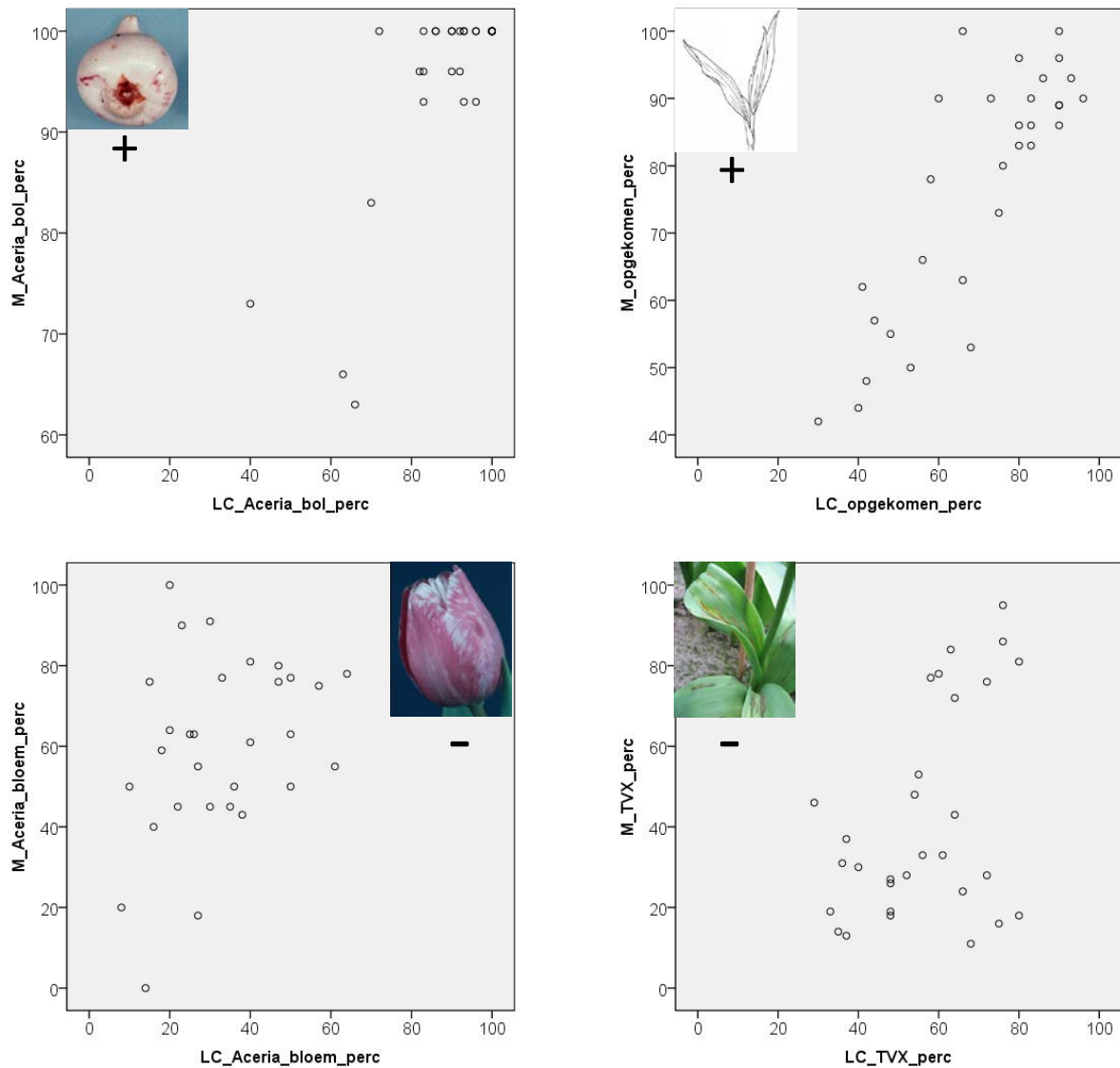
Elke individuele plant is gevolgd en gescoord op meerdere eigenschappen (Figuur 8) zodat een analyse gemaakt worden van de relatie tussen die eigenschappen. Figuur 11 geeft een samenvatting van deze analyse. Zo is te zien dat bollen met symptomen van galmijt op de bol een veel lagere opkomst hebben dan bollen zonder symptomen op de bol. Er is echter geen relatie tussen symptomen van galmijt op de bol en symptomen van galmijt op de bloem: bollen zonder zichtbare symptomen op de bol kunnen toch bloemsymptomen ontwikkelen en andersom. Op meerdere bloemen met symptomen van galmijten werden levende galmijten op de bloemblaadjes en op de meeldraden aangetroffen. Bollen met symptomen van galmijt op de bol hebben vaker TVX dan bollen zonder galmijtsymptomen. Planten met galmijt bloemsymptomen hebben daarentegen niet vaker TVX dan planten zonder bloemsymptomen.

Figuur 11. (volgende bladzijde) Relatie tussen twee symptomen (plaatjes links) binnen individuele planten van elk cultivar (La Courtine en Menton). Plussen staan voor een significante relatie, minnen geven aan dat er geen significante relatie is. De figuren geven percentages planten van het totaal weer.

	La Courtine	Menton
 en 	+ % opkomst  Conclusie: bollen met symptomen van galmijt op de bol komen slechter op.	+ % opkomst 
 en 	- % galmijt bloemsymptomen  Conclusie: er is geen 1 op 1 verband tussen symptomen van galmijt op de bol en op de bloem. Bollen zonder zichtbare symptomen op de bol kunnen toch bloemsymptomen ontwikkelen en anders om.	- % galmijt bloemsymptomen 
 en 	+ % TVX  Conclusie: bollen met symptomen van galmijt op de bol hebben vaker TVX dan bollen zonder galmijtsymptomen.	+ % TVX 
 en 	- % TVX  Conclusie: er is geen verband tussen symptomen van galmijt op de bloem en TVX in de plant. Bollen met en zonder symptomen van galmijt op de bloem hebben even vaak TVX.	- % TVX 

Relatie tussen symptomen van twee cultivars binnen één herhaling

De twee cultivars zijn in elke herhaling door elkaar in een zakje bewaard en daarna apart van elkaar geplant. Figuur 12 geeft weer in hoeverre de symptomen van de verschillende cultivars binnen herhalingen verband houden met elkaar. Er is een positief verband tussen het percentage galmijt bolsymptomen van beide cultivars. Er is ook een positief verband tussen de opkomst van beide cultivars. Er is geen significant verband tussen de cultivars gevonden in het percentage galmijt bloesymptomen en het percentage TVX.



Figuur 12. Relatie tussen symptomen van twee cultivars binnen één herhaling. Elk plot laat een andere eigenschap zien, elk punt is een herhaling (een zakje), het percentage van La Courtine (LC) staat op de horizontale as, het percentage Menton (M) op de verticale as. Een plus onder het plaatje betekent dat het verband tussen de cultivars significant is, een min dat er geen significant verband is.

Het effect van behandelingen

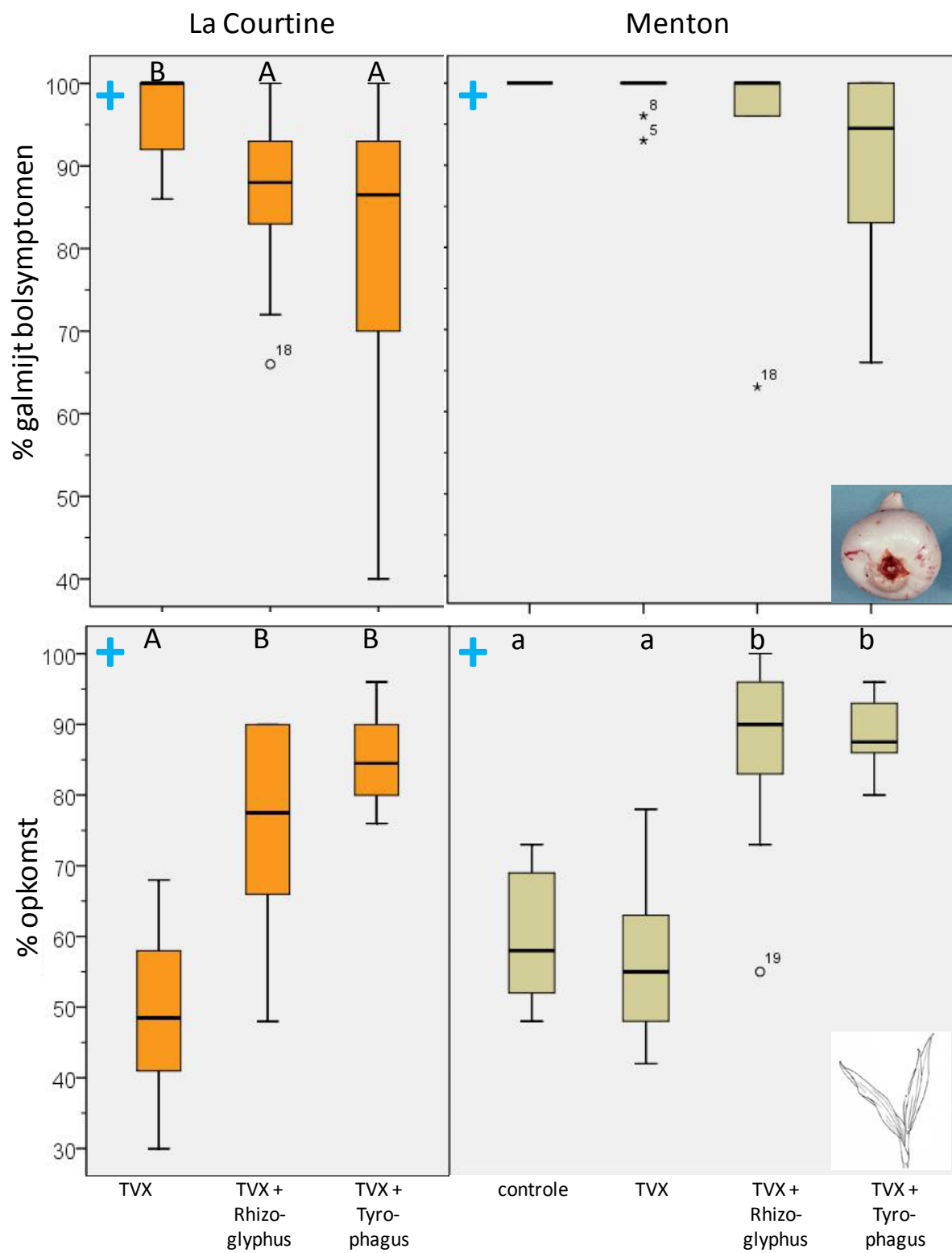
Figuur 13 laat het effect van de behandelingen op verschillende symptomen in beide cultivars zien.

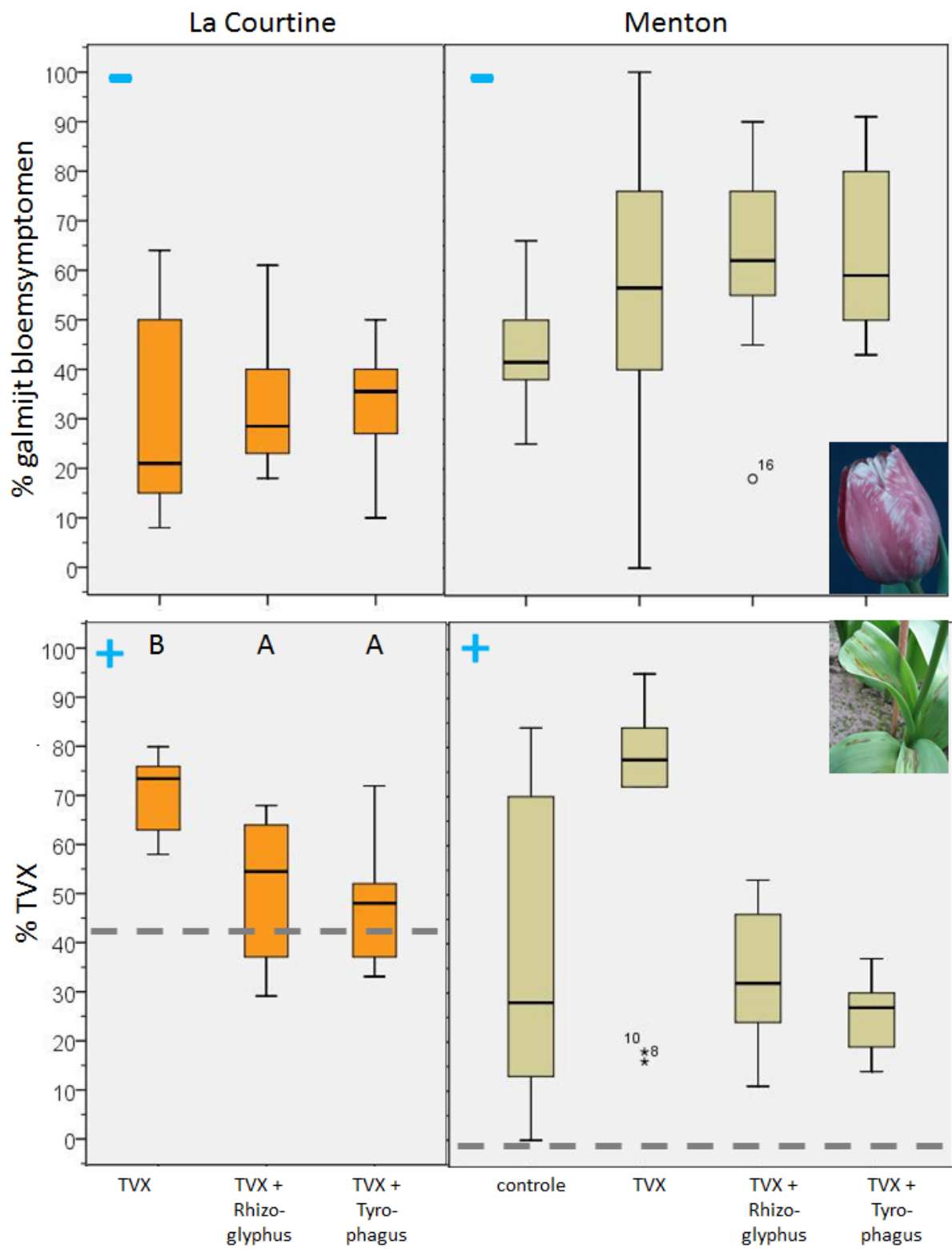
Het percentage TVX in de controlebehandeling in Menton is in totaal 39,5. Dat had volgens de opzet van de proef 0% moeten blijven. Dat betekent dat ergens onverwachts TVX-verspreiding heeft plaatsgevonden. Dat heeft tot gevolg dat de resultaten van de andere behandelingen met dit percentage moeten worden vergeleken.

In cultivar Menton kan de controlebehandeling “controle” (alleen Menton in de zakjes) worden vergeleken met de behandeling “TVX” (Menton en La Courtine samen in het zakje). In beide behandelingen zijn geen mijten bewust toegevoegd, maar alle behandelingen hebben een kleine natuurlijke besmetting met *Rhizoglyphus* of *Tyrophagus* en zijn bovendien zwaar besmet met tulpengalmijt. In beide behandelingen zijn de symptomen van de galmijtinfectie zeer duidelijk aanwezig in de bewaring (galmijt bolsymptomen) en in de kas (opkomst en galmijt bloemssymptomen). De behandelingen verschillen echter niet van elkaar in het percentage van deze symptomen. Ze verschillen wel in percentage TVX: dat is veel hoger in de behandeling “TVX” dan in de controle. Dit duidt erop dat TVX in de bewaring kan worden overgedragen in de aanwezigheid van mijten. Dit zien we ook terug in de behandeling “TVX” van La Courtine. Hier is het percentage TVX immers ook opgelopen van 44% tot 70.8%.

De overall analyse van alle behandelingen geeft aan dat er een significant effect is van de uitgevoerde behandelingen op galmijt bolsymptomen, opkomst en TVX. Toevoeging van *Rhizoglyphus* of *Tyrophagus* resulteert in La Courtine namelijk in significant minder galmijt bolsymptomen, een hogere opkomst én minder TVX. In Menton is de trend precies hetzelfde (maar de verschillen waren niet altijd significant). De toevoeging van grote aantallen *Rhizoglyphus* of *Tyrophagus* aan een mix van viruszieke en virusvrije bollen lijkt te voorkomen dat er een toename van TVX optreedt ten opzichte van de controle waar geen TVX-zieke partij aanwezig was.

Figuur 13. (volgende twee pagina's) Effect van behandelingen op symptomen. Achtereenvolgens worden de resultaten weergegeven voor percentage galmijt bolsymptomen, opkomst, galmijt bloemssymptomen en TVX. Resultaten zijn apart weergegeven voor de TVX-zieke partij La Courtine (linker panel, oranje) en de virusvrije partij Menton (rechter panel, beige). De gekleurde balkjes en de uitlopers naar boven en beneden geven de variatie van de waarden aan. Het horizontale streepje in het gekleurde balkje geeft de middelste waarde aan. In elk figuur geeft een blauw plusteken aan dat er significante verschillen werden gevonden tussen behandelingen. De letters boven de behandelingen geven vervolgens aan welke behandelingen van elkaar verschillen (dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar). Een minteken geeft aan dat er geen significante verschillen tussen de behandelingen werden aangetoond. In de figuur met TVX geven de grijze stippellijnen het uitgangspcentage TVX van de partij voor aanvang van de proef aan.





Verspreiding van TVX in de kas

Tijdens de teelt van virusvrije- en TVX-tulpen in een vollegrondskas zijn er 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. Er heeft op geen enkele wijze tijdens de teeltfase mechanische verspreiding kunnen plaatsvinden. Daarnaast kan ook uitgesloten worden dat deze verspreiding tijdens de bewaring heeft plaatsgevonden. In vergelijkbare proefopzet uit een ander onderzoek waarbij partijen met en zonder tulpengalmijt zijn gebruikt, is geen enkele verspreiding van tulpengalmijt waargenomen.

In §7.4 wordt een uitgebreidere analyse gedaan op welke wijze de verspreiding van TVX in de kas heeft kunnen plaatsvinden.

Virusreservoirs in de kas

Na het rooien van de proeven heeft op verzoek spontane onkruidgroei kunnen plaatsvinden. In de spontaan opgekomen kleine brandnetel (*Urtica urens*) is in het blad en wortel TVX aangetoond. Dit bevestigt dat de waardplantenreeks van TVX breder is dan tulp alleen. Dit resultaat suggereert bovendien dat onkruiden een reservoir kunnen zijn voor virussen (zie voor een uitgebreidere toelichting ook §3.3). De aanwezigheid van TVX in kleine brandnetel suggereert daarnaast een verspreiding van TVX vanuit tulp naar kleine brandnetel aansluitend op de teelt van de tulp (virusverspreiding over teelten heen).

6.4.8 Discussie en conclusies

TVX

- TVX kan tussen oogst en bloei met tientallen procenten toenemen.
- In de proef met bollen- en stromijten was het percentage TVX veel hoger in de behandeling “TVX” (met virusbron) dan in de controle (zonder virusbron). In alle behandelingen was tulpengalmijt aanwezig. Daarom duidt dit resultaat erop dat TVX in de bewaring kan worden overgedragen in de aanwezigheid van tulpengalmijt.
- In de proef met bollen- en stromijten was er een significant verband tussen symptomen van galmijten op de bol en TVX. Dit ondersteunt de theorie dat tulpengalmijten in de bewaring een belangrijke vector zijn voor TVX.
- In de proef met bollen- en stromijten is TVX sterk toegenomen in alle behandelingen met virusbron en mijten. In alle behandelingen was een lichte natuurlijke infectie van *Rhizoglyphus* en *Tyrophagus* aanwezig. Daarnaast was er een zeer zware infectie van tulpengalmijt. Meer dan 90% van alle bollen in de proeven vertoonden galmijt bolsymptomen. Extra toevoeging van *Rhizoglyphus* of *Tyrophagus* resulteerde echter in een minder sterke toename van TVX dan wanneer alleen de natuurlijke besmetting en tulpengalmijt aanwezig was. Daarom ondersteunen deze resultaten de theorie dat tulpengalmijt een vector is van TVX. In praktijk lijken *Rhizoglyphus* en *Tyrophagus* juist een negatief effect te hebben op tulpengalmijt. Dit zou te maken kunnen hebben met competitie voor voedsel, verstoring van de galmijten door *Rhizoglyphus* of *Tyrophagus*, of indirecte interacties tussen de mijtensoorten via een andere component (zoals een roofmijt).
- In beide proeven is TVX onverwachts ook sterk toegenomen in de controlebehandelingen zonder virusbron. Dit doet vermoeden dat TVX ook nog op een ander moment en locatie dan in de bewaring kan worden overgedragen.
- In de proef met tulpengalmijt was er net zo’n grote toename van TVX in de behandelingen met virusbron als in behandelingen zonder virusbron. Dit ondersteunt het vermoeden dat overdracht van TVX niet alléén in de bewaring binnen zakjes heeft plaatsgevonden.
- In beide proeven was er geen verband tussen de twee cultivars die samen in een zakje hadden gezeten wat betreft het percentage TVX. Dit ondersteunt het vermoeden dat overdracht van TVX niet alléén in de bewaring binnen zakjes heeft plaatsgevonden.
- Bovenstaande resultaten geven een indicatie dat TVX ook na de bewaring nog kan worden overgedragen in de kas.
- Verspreiding bovengronds in de kas is onwaarschijnlijk.

- In de kas is ondergrondse verspreiding van TVX het meest aannemelijk. De waarschijnlijkste vectoren zijn schimmel-achtigen zoals soorten van *Olpidium*, *Polymyxa* en *Spongospora*. Verspreiding via water of bollen- en stromijten is echter niet uit te sluiten. Het lijkt erop dat deze vector TVX over flinke afstanden kan verspreiden (verspreiding tussen verschillende plantbedden).
- In de kassen waar de proeven hebben gestaan, is na afloop brandnetel opgekomen waarin TVX is aangetroffen. Dit suggereert dat onkruid een reservoir is voor TVX.

Tulpengalmijt

- Infectie van galmijt in de bewaring kan grote gevolgen hebben voor de kwaliteit van de plant. De kans op opkomst is kleiner en bij opkomst er is kans op bloemsymptomen.
- Niet elke bol met galmijtsymptomen op de bol ontwikkelt ook symptomen van galmijt op de bloem. Bloemsymptomen ontstaan waarschijnlijk alleen wanneer galmijten zich na bloemaanleg tijdens het strekken op de plant en het groeien van de bloem op de bloemdelen bevinden. Dat betekent dat een beoordeling van bloemsymptomen alleen onvoldoende is om een infectie met galmijten in een partij met zekerheid vast te kunnen stellen.
- Galmijt bloemsymptomen kunnen zich daarentegen ook ontwikkelen op bollen die géén symptomen op de bol vertoonden. Deze bollen zaten wel in een partij met galmijtinfestatie, dus mogelijk hadden ze een onzichtbare infectie van galmijten in de bewaring, bijvoorbeeld doordat de aantallen galmijten klein waren, doordat de mijten dieper in de bol zaten, of doordat de infectie pas laat in de bewaring is ontstaan. Tenslotte kunnen we niet uitsluiten dat galmijten zich na planten van de bollen nog ondergronds tussen de bollen of bovengronds tussen de planten verspreiden. We verwachten echter niet dat dit een belangrijke verspreidingsroute is.
- Er was geen verband tussen de twee cultivars die samen in een zakje hadden gezeten wat betreft het percentage galmijt bloemsymptomen. Dit geeft ook aan dat de ontwikkeling van bloemsymptomen in elk geval niet alleen wordt bepaald door de mate van infectie in de bewaring.
- De variatie in de mate van galmijt bloemsymptomen is groot: van enkele stipjes tot grote ontkleuring. Uit deze proef wordt niet duidelijk waardoor deze variatie wordt verklaard. Mogelijk houdt het verband met de mate van infectie of de locatie van de galmijten in de bol.
- Er was een sterk verband tussen de twee cultivars die samen in een zakje hadden gezeten wat betreft percentage galmijt bolsymptomen en wat betreft opkomst. Dat ondersteunt het vermoeden dat deze symptomen gedurende de bewaring veroorzaakt zijn. Het is inderdaad bekend dat galmijten zich tijdens de bewaring vermenigvuldigen en verspreiden.

6.5 Algemene conclusie

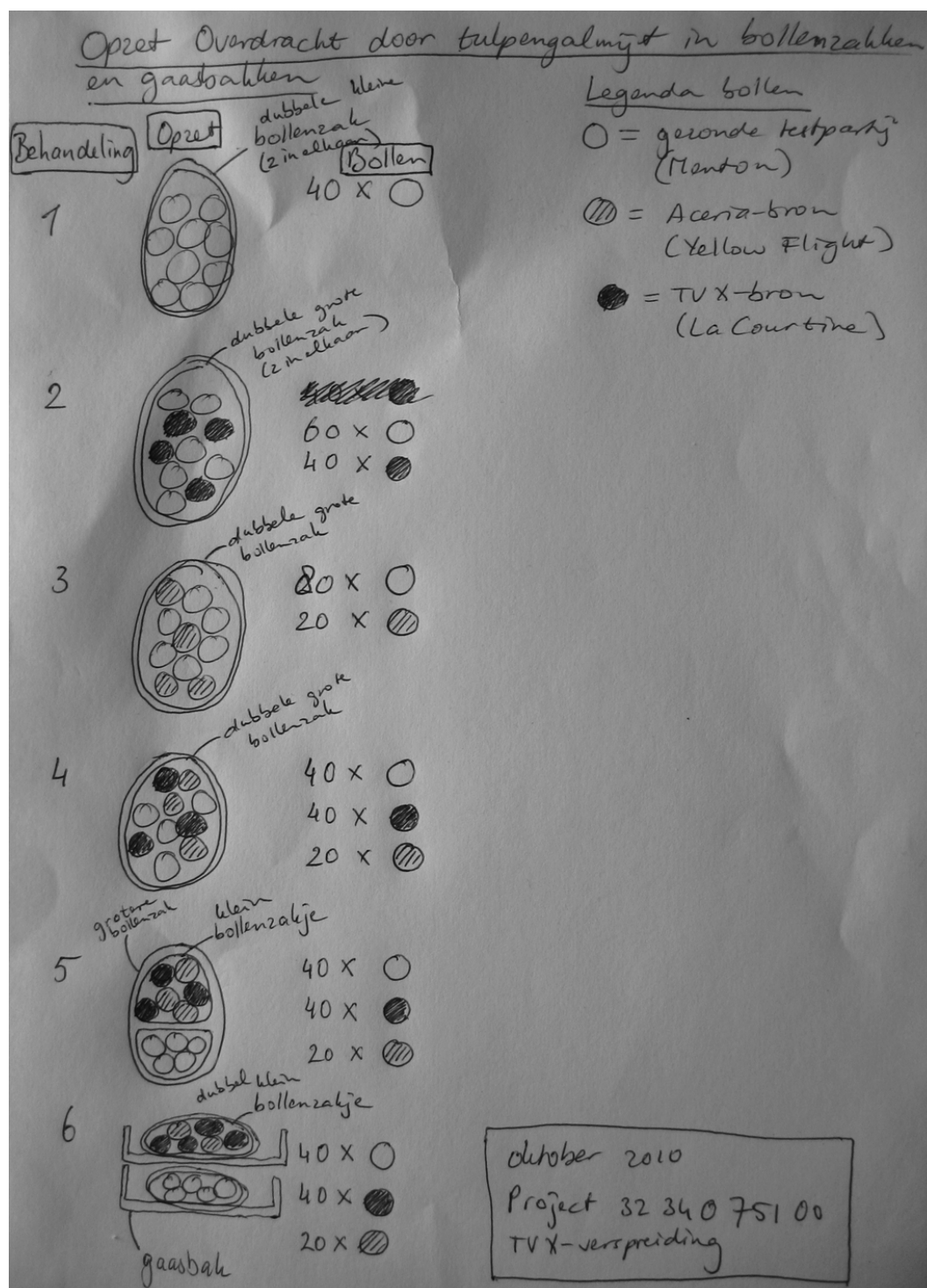
- Na verwerking van de bollen na de oogst kan TVX tijdens de bewaring nog zeer sterk toenemen (tientallen procenten toename).
- Deze verspreiding van TVX kan plaatsvinden in de bewaring en in de nateelt.
- Tulpengalmijt lijkt de belangrijkste vector van TVX in de bewaring.
- In de nateelt wordt TVX waarschijnlijk verspreid door een tot nog toe onbekende bodemgebonden vector. De waarschijnlijke vectoren zijn schimmel-achtigen zoals *Oplidium*, *Polymyxa* en *Spongospora*. Verspreiding via water of bollen- en stromijten is echter niet uit te sluiten.

6.6 Aanbevelingen voor de praktijk

- Tulpengalmijt met zorg bestrijden. Volgen van partijen door jaarrond waarnemingen te doen en vervolgens op het juiste moment adequate maatregelen treffen. Zie folder 'Beheersing tulpengalmijt in teelt, handel en broeierij', uit 2011, te downloaden via de website van het PT onder PT-project 14262-02 of via <http://edepot.wur.nl/178217>.
- Andere mijten voorkomen door het opruimen van zure bollen.
- Tulpen niet telen op grond waar eerder TVX is aangetroffen.

6.7 Bijlagen - Virusoverdracht door mijten

Opzet van het experiment 'TVX overdracht na infectie met tulpengalmijt in de bewaring 2010'



Schema: behandelingen in bewaring



Foto: behandelingen in bewaring

bed 1 (Menton)			bed 2 (Menton)			bed 3 (La Courtine)			bed 4 (Yellow Flight)		
	6B			6D			6D			6D	
	5B			5D			5D			5D	
	4B			4D			4D			4D	
	3B			3D			2D			3D	
	3B			3D			6C			6C	
	2B			2D			5C			5C	
	2B			2D			4C			4C	
	1B			1D			2C			3C	
	6A			6C			6B			6B	
	5A			5C			5B			5B	
	4A			4C			4B			4B	
	3A			3C			2B			3B	
	3A			3C			6A			6A	
	2A			2C			5A			5A	
	2A			2C			4A			4A	
	1A			1C			2A			3A	
deurzijde											

Schema: opplant in de vollegrondskas. Nummers geven behandelingen weer, letters zijn herhalingen (zie materiaal en methoden).

Opzet van het experiment 'TVX overdracht na infectie met bollenmijten en stromijten in de bewaring 2010'

Schema: opplant in de vollegrondskas. Nummers geven behandelingen weer (1=controle, 2=TVX, 3=TVX+Rhizoglyphus, 4= TVX+Tyrophagus), letters A-J zijn herhalingen, M=cultivar Menton, LC=cultivar La Courtine. Details in materiaal en methoden.

kas 26: bollen zonder symptomen van tulpengalmijt op de bol											
bed 1			bed 2			bed 3			bed 4		
3A	(LC)										
3A	(M)										
3B	(LC)										
3C	(LC)										
3D	(LC)										
3E	(LC)		4B	(LC)							
3E	(LC)		4B	(M)							
3G	(LC)		4C	(LC)							
3G	(M)		4C	(M)							
3H	(LC)		4D	(LC)							
3H	(M)		4E	(LC)							
3J	(LC)		4E	(M)							
			4F	(LC)							
			4F	(M)							
2C	(LC)		4G	(LC)							
2E	(LC)		4H	(LC)							
2E	(M)		4I	(LC)							
2H	(LC)		4I	(M)							
2H	(M)		4J	(LC)							
2I	(LC)		4J	(M)							

kas 27: bollen met symptomen van tulpengalmijt op de bol											
bed 1			bed 2			bed 3			bed 4		
			2A	(LC)		3A	(LC)		4A	(LC)	
1A	(M)		2A	(M)		3A	(M)		4A	(M)	
			2B	(LC)		3B	(LC)		4B	(LC)	
1B	(M)		2B	(M)		3B	(M)		4B	(M)	
			2C	(LC)		3C	(LC)		4C	(LC)	
1C	(M)		2C	(M)		3C	(M)		4C	(M)	
			2D	(LC)		3D	(LC)		4D	(LC)	
1D	(M)		2D	(M)		3D	(M)		4D	(M)	
			2E	(LC)		3E	(LC)		4E	(LC)	
1E	(M)		2E	(M)		3E	(M)		4E	(M)	
			2F	(LC)		3F	(LC)		4F	(LC)	
1F	(M)		2F	(M)		3F	(M)		4F	(M)	
			2G	(LC)		3G	(LC)		4G	(LC)	
1G	(M)		2G	(M)		3G	(M)		4G	(M)	
			2H	(LC)		3H	(LC)		4H	(LC)	
1H	(M)		2H	(M)		3H	(M)		4H	(M)	
			2I	(LC)		3I	(LC)		4I	(LC)	
1I	(M)		2I	(M)		3I	(M)		4I	(M)	
			2J	(LC)		3J	(LC)		4J	(LC)	
1J	(M)		2J	(M)		3J	(M)		4J	(M)	

7 Virusoverdracht door bodemgebonden vectoren

7.1 Risico's TVX-geïnficeerd bladmateriaal

7.1.1 Introductie

Het was onbekend of de aanwezigheid van virusgeïnficeerd plantmateriaal in de grond tijdens de teelt van tulp een infectiebron van TVX kon zijn. Virusgeïnficeerd plantmateriaal in, of op de grond ontstaat bij het koppen, afmaaien en oogsten van TVX-geïnficeerde partijen. Uit waardplantonderzoek is bekend dat snijbiet, wortel en lelie vatbaar zijn voor TVX (Hoofdstuk 3). Er is helaas geen informatie bekend over de aanwezigheid van TVX van regulier geteelde snijbiet en wortel. Er zijn enkele incidenten bekend van TVX in lelie. Daarnaast is TVX aangetroffen in kleine brandnetel en melganzervoet (Hoofdstuk 3).

7.1.2 Werkwijze

Het risico op infectie met TVX tijdens de teelt van virusvrije tulpen is in 2009 en 2010 onderzocht door grond van de Proeftuin in Lisse voorafgaand aan het planten van de bollen te verrijken met virusgeïnficeerd bladmateriaal. De beplanting met virusvrije tulpen (cv. Ben van Zanten) vond plaats in 30x30 cm vijvermandjes. Het TVX-geïnficeerde bladmateriaal was in mei van het voorafgaande teeltseizoen geoogst van TVX-geïnficeerde tulpen (cv. Blue Herron, 79% TVX) en was tot aan het gebruik bewaard bij -20°C. Ter controle zijn virusvrije tulpen (cv. Ben van Zanten) in mandjes geplant waarbij de grond niet was verrijkt met TVX-geïnficeerd bladmateriaal.

De beplanting van virusvrije tulpen (cv. Ben van Zanten) is uitgevoerd in 2009 en in 2010. In december 2009 (week 49) zijn de mandjes direct aansluitend op het planten ingegraven op de Proeftuin in Lisse. Vanwege de vroeg ingevallen winter, was ingraven van de mandjes aansluitend op het planten in december 2010 (week 49) helaas niet meer mogelijk. De mandjes zijn bij daarom bij een temperatuur van $\pm 5^{\circ}\text{C}$ weggezet en in februari ingegraven toen de grond niet meer bevroren was. Tussentijds is de grond in de mandjes kunstmatig vochtig gehouden. Tijdens het daaropvolgende groeiseizoen is drie weken na de bloei het percentage TVX bepaald m.b.v. een ELISA-toets aan het blad.

In december 2010 is de grond welke gemengd was met TVX-geïnficeerd bladmateriaal ook gebruikt voor de opplant van vangplanten (*Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor* en *Chenopodium quinoa*). Per gewas zijn 3 potten met elk 4 zaailingen geplant. Deze drie gewassen zijn vatbaar voor TVX (Hoofdstuk 3). Mocht bodemgebonden infectie van TVX optreden, dan zou dat mogelijk detecteerbaar zijn in deze vangplanten. De opplant van zaailingen en de aansluitende groei van deze gewassen vond plaats in een kas bij een constante temperatuur van 20°C. Vlak voor de bloei zijn deze planten met ELISA getoetst op aanwezigheid van TVX.

7.1.3 Resultaten en discussie

In Tabel 13 zijn de resultaten weergegeven van teelt op grond die wel of niet verrijkt is met TVX-geïnficeerd bladmateriaal. Tijdens teeltseizoen 2009/2010 heeft er een aanzienlijke infectie met TVX plaatsgevonden. Vijfentwintig van de 200 virusvrije tulpen raakten besmet met TVX, een infectiepercentage van 12.5%. Een dergelijke toename aan TVX is niet waargenomen tijdens het onderzoek naar risico's van mechanische verspreiding van TVX. Zoals verwacht bleven de tulpen vrij van virus wanneer deze op grond zonder TVX-geïnficeerd bladmateriaal geteeld werden.

Opvallend is dat bij herhaling van dit onderzoek in 2010/2011 zeer beperkte virusinfectie werd waargenomen. Slechts één van de 290 planten raakte geïnficeerd met TVX. Zoals verwacht bleven de tulpen vrij van virus wanneer deze op grond zonder TVX-geïnficeerd bladmateriaal geteeld werden.

De opplant van *N. benthamiana*, *C. amaranticolor* en *C. quinoa* op grond welke verrijkt was met TVX-geïnficeerde bladresten resulteerde in geen van de gevallen in een TVX-infectie. Net als tijdens mandjesproef op het veld werd in de kas ook geen bodemgebonden verspreiding waargenomen.

Zowel in 2009 als in 2010 is voor dit onderzoek zandgrond van de Proeftuin in Lisse gebruikt. Er werd verondersteld dat de grondsamenstelling daarmee tussen de twee onderzoeksjaren gelijk was.

Details over de aanwezige bodemorganismen ontbreekt, maar uit meerjarige nematodenanalyse is bekend dat de virusvectoren *Xiphinema diversicaudatum* (vector van *Arabid*-mozaïekvirus) en (*para*)*Trichodorus* nematoden (vector van Tabaksratelvirus) afwezig zijn. Opvallend verschil tussen de twee onderzoeksjaren is daarentegen het wel of niet direct ingraven van de mandjes aansluitend op het planten. Het is aannemelijk dat de bodemvochtigheid en bodemtemperatuur tussen de twee onderzoeksjaren verschilden. Het is onduidelijk of één of beide van deze eigenschappen een rol speelde bij het wel of niet optreden van TVX waargenomen infecties. Er is tijdens dit deelproject geen onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van *Olpidium* in deze grond.

Tabel 13. Mate van infectie met TVX tijdens teelt op grond welke verrijkt is met TVX-geïnfecteerd bladmateriaal.

Onderzoeksjaar	Aanwezigheid TVX-geïnfecteerd bladmateriaal in grond	%TVX tijdens teeltseizoen
2009/2010	Nee	0% (n=100)
	Ja	12.5% (n=200)
2010/2011	Nee	0% (n=287)
	Ja	0.3% (n=290)

7.1.4 Conclusie

Een infectie van tulp met TVX vanuit de bodem is experimenteel aangetoond. Virusbesmet plantmateriaal functioneerde in dit onderzoek als infectiebron. Nog onbekende factoren zijn bepalend voor de mate van bodemgebonden infectie met TVX.

7.2 Betrokkenheid nematoden

7.2.1 Introductie

Diverse groepen van virussen kunnen door nematoden worden verspreid. Zo worden het nepovirus *Arabid*-mozaïekvirus door het vrijlevende aaltje *Xiphinema diversicaudatum* verspreid het nepovirus tomatenzwartkringvirus door Longidorus nematoden. Het Tobravirus Tabaksratelvirus wordt daarentegen door diverse soorten trichodoride en para-trichodoride aaltjes verspreid. Tulpenvirus X behoort tot de potexvirussen. Vanuit de wetenschappelijke literatuur zijn geen voorbeelden bekend van potexvirusverspreiding door nematoden. In dit onderdeel wordt onderzocht of bovengenoemde nematoden betrokken kunnen zijn bij de verspreiding van TVX.

7.2.2 Werkwijze

Tulpen van cv. Gordon Cooper (7% TVX. 0% ArMV) zijn in drie herhalingen met veldjes van 150 tulpen geteeld op een perceel in de omgeving van Heerhugowaard, (kleigrond, 15% afslibbaar) waarin de volgende virusvectoren aanwezig waren:

Nematode	aantal nematoden (per 300 gram grond)
<i>Longidorus</i> spp.	13
<i>Trichodorus</i> spp.	10
<i>Trichodorus similis</i>	1
<i>Xiphinema diversicaudatum</i>	32

Deze beplantingen waren betrokken bij onderzoek naar verspreiding van *Arabid*-mozaïekvirus in tulp en andere bolgewassen (De Kock et al, 2011). ArMV wordt verspreid door *X. diversicaudatum* en het was bekend dat op de teeltlocatie virulente nematoden aanwezig waren. Aan het einde van het groeiseizoen zijn de planten aan het blad met ELISA getoetst op aanwezigheid van ArMV en TVX.

Percentages TVX en ArMV zijn vergeleken met de viruspercentages voor het planten.

7.2.3 Resultaten en Discussie

In Tabel 14 zijn de resultaten weergegeven van de virusanalyses na een teelt op grond waarin diverse bodemgebonden virusvectoren aanwezig waren. De percentages TVX tijdens de teelt van cv. Gordon Cooper namen niet toe; een percentage TVX van 1% bij herhaling 3 is zelfs significant lager dan het aanvangspercentage van 7%. Mogelijk dat steekproefgrootte/bemonstering een rol heeft gespeeld bij het bepalen van het uitgangpercentage waardoor een gemiddeld percentage van ~3% (het gemiddelde van 3, 4 en 1%) meer past bij het uitgangpercentage TVX van deze partij. Het percentage ArMV nam tijdens de teelt wel drastisch toe: van virusvrij naar gemiddeld 40,6%. Deze resultaten geven aan dat er in ieder geval ArMV-verspreiding via *X. diversicaudatum* heeft plaatsgevonden. De virustoenname van ArMV is in detail besproken in De Kock et al (2011).

De aantallen *Longidorus* en *Trichodorus* zouden hoog genoeg moeten zijn voor virusoverdracht wanneer één van deze nematoden een virusvector voor TVX zou zijn. Vanuit praktijkervaringen m.b.t. overdracht van TRV in Hosta is bekend geworden dat twee *Trichodorus* nematoden per 300 gram grond al genoeg is voor TRV-infecties tijdens de teelt van Hosta (Project Virusarme Teelt Vaste Planten (PT project 13732), niet gepubliceerde resultaten).

Het resultaat dat in aanwezigheid van de drie bekende nematode-virusvectoren geen verspreiding van TVX heeft opgetreden, geeft voldoende aanwijzing dat virusvectoren als *Longidorus*, *Trichodorus*, en *Xiphinema diversicaudatum* vooralsnog niet als vector voor TVX beschouwd kunnen worden.

Tabel 14. Percentages TVX en ArMV bij cv. Gordon Cooper voorafgaand aan planten en aansluitend op een teeltseizoen op een perceel waarin diverse virusvectoren aanwezig waren.

% TVX		% ArMV	
Voor planten	Einde van teelt	Voor planten	Einde van teelt
7% (n=100)	3% (n=100, herhaling 1)	0% (n=100)	50% (n=100, herhaling 1)
	4% (n=100, herhaling 2)		38% (n=100, herhaling 2)
	1% (n=100, herhaling 3)		34% (n=100, herhaling 3)

Tijdens de nateelt voor onderzoek naar virusoverdracht door mijten (§6.4) zijn aanwijzingen gevonden voor verspreiding tijdens de teelt. Een bodemgebonden verspreiding is het meest aannemelijk. In de kassen waar deze bodemgebonden TVX-verspreiding heeft plaatsgevonden waren *Xiphinema*-nematoden afwezig. In één van de kassen was *Paratrichodorus nanus* aanwezig (5 individuen per 250 ml grond). In de overige kassen waar bodemgebonden verspreiding van TVX is waargenomen, waren geen (*para*)*Trichodorus* nematoden aanwezig.

7.2.4 Conclusies

Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat *Longidorus*, (*para*)*Trichodorus*, en *Xiphinema diversicaudatum* betrokken zijn bij de bodemgebonden verspreiding van TVX.

7.3 Betrokkenheid van schimmels

Er zijn drie geslachten van schimmels bekend die ieder betrokken kunnen zijn bij de verspreiding van specifieke schimmels:

- *Olpidium brassicae* en *O. virulentus*
- *Polymyxa graminis*
- *Spongospora*

Olpidium brassicae is in de bloembollensector bekend als de vector van tabaksnecrosevirus. Dit virus veroorzaakt Augustaziek bij tulp.

Bij aanvang van dit project was geen van deze schimmels ooit in relatie gebracht met de verspreiding van potexvirussen zoals TVX. In 2010 is echter bij vollegrondse geteelde tomaat verspreiding van *Pepino mosaic virus* (PepMV) door de bodemschimmel *Olpidium virulentus* beschreven (Alfaro-Fernández et al. 2010). PepMV is net als TVX een potexvirus.

Wortels van tulpen afkomstig uit de nateelt in de kas (§6.4) zijn bestudeerd op aanwezigheid van *Olpidium*. Microscopische analyse van wortels liet duidelijke celstructuren zien die typisch zijn voor *Olpidium* (Weber and Webster, 2000). Naast microscopische analyse kunnen *Olpidium* schimmels ook met moleculaire diagnostiek worden aangetoond (Herrera-Vásquez et al. 2009). Met PCR kon de aanwezigheid van *Olpidium* op wortels van tulpen afkomstig uit de kas (§6.4) bevestigd worden.

Zowel microscopische analyse als moleculaire diagnostiek heeft de aanwezigheid van een potentiële vector voor potexvirussen aangetoond. Daarmee is nog geen bewijs geleverd dat *Olpidium* daadwerkelijk betrokken is bij de bodemgebonden verspreiding van TVX.

7.4 Bodemgebonden verspreiding TVX – maar hoe?

Literatuuronderzoek, ervaringen uit de praktijk en ook dit onderzoek (§6.4 en §7.1) resulteerden in onderstaande lijst van mogelijke verspreidingsroutes van TVX via de bodem. Bij elk van de routes is aangegeven hoe waarschijnlijk deze route is voor bodemgebonden verspreiding van TVX.

- **Lucht.** *Zeer onwaarschijnlijk.* Het is niet bekend dat virusdeeltjes zich via de lucht verspreiden.
- **Insecten bovengronds.** *Zeer onwaarschijnlijk.* Er was gespoten tegen bladluizen en er zijn geen andere insecten aangetroffen.
- **Wortel-wortel contact.** *Onwaarschijnlijk.* Hierbij moet beide wortels namelijk beschadigd zijn.
- **Tulpengalmijt.** *Onwaarschijnlijk* als vector in de kas. Tulpengalmijt is sterk gebonden aan zijn waardplant. Het is niet waarschijnlijk dat deze mijten ondergronds grote afstanden afleggen. Tulpengalmijten zijn in de proef waargenomen in de bloemen. Hoewel het bekend is dat bepaalde verwante galmijten zich via de wind verspreiden, was er in de kassen nauwelijks een luchtstroom. Bovendien was er in geen van beide proeven een significant verband tussen symptomen van tulpengalmijten in de bloemen en het voorkomen van TVX in diezelfde plant. Dat zou wel te verwachten zijn wanneer tulpengalmijt bovengronds in de kas een belangrijke vector van TVX zou zijn.
- **Nematoden.** *Onwaarschijnlijk.* Bepaalde nematoden zijn bekend als vector van plantenvirussen. Verspreiding van potexvirussen zoals TVX via nematoden is echter nooit eerder gerapporteerd. Daarnaast heeft dit project geen aanwijzingen opgeleverd die suggereren dat virusvectoren als (*para*) *Trichodorus*- of *Xiphinema*-nematoden een rol spelen bij deze bodemgebonden verspreidingsroute (zie §6.4.7 en §7.2).
- **Water.** *Mogelijk.* In lelie zijn virusdeeltjes (van een ander virus) aangetroffen in water dat in aanraking was geweest met de wortels.
- **Bollen- en stromijten.** *Mogelijk.* Een aantal bollen zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van bollen- en stromijten na bloei. Er zijn inderdaad bollen- en stromijten aangetroffen. Het is bekend dat deze mijten van nature in de grond voorkomen, dus het is goed mogelijk dat ze zich van bol tot bol verplaatsen in de grond. Plantenmateriaal is echter niet hun voorkeursvoedsel. Deze mijten zijn dus niet uit te sluiten als vector van TVX.
- **Schimmels en schimmelachtigen.** *Zeer goed mogelijk.* Er zijn voorbeelden bekend van schimmels en schimmelachtigen die vector zijn van plantenvirussen. In onze proeven speelde *Olpidium* mogelijk een rol als vector van TVX. Zoösporen zijn waargenomen op de wortels van meerdere tulpenbollen uit de proef en wortels van tulpen is met behulp van PCR aangetoond dat deze sporen van een *Olpidium*-soort waren. Er heeft nog onvoldoende onderzoek plaatsgevonden naar de aanwezigheid van andere vectoren van specifieke virussen. *Polymyxa* en *Spongospora*.

Kort samengevat zijn er diverse concrete aanwijzingen voor verspreiding van TVX via een bodemgebonden vector. De schimmel *Olpidium* is in deze vooralsnog de hoofdverdachte, maar verspreiding via water en bollen- en stromijten is nog niet uit te sluiten. Praktijkmaatregelen zijn pas te formuleren wanneer deze verspreidingsroute experimenteel bevestigd is en daarop ligt de focus in dit project.

Vervolgonderzoek naar de identificatie van de bodemgebonden vector voor TVX richt op de volgende onderwerpen:

1. Bepalen hoe bodemgebonden verspreiding van TVX plaats vindt. Het onderzoek richt zich met name op potentiële betrokkenheid van specifieke schimmels. Ook wordt nog steeds potentiële verspreiding via nematoden en een niet vector-gebonden virusoverdracht door wortel-wortel contact betrokken bij het onderzoek.
2. Op basis van verkregen kennis hoe bodemgebonden verspreiding van TVX plaats vindt, kunnen maatregelen opgesteld worden die bodemgebonden verspreiding van TVX voorkomen of beperken. Dit project doet geen onderzoek naar de efficiëntie van deze maatregelen.

8 Maatregelen voor de praktijk

Virusbron aanpakken door bedrijfshygiëne

- Werk met getoetst virusvrije partijen.
- Ziekzoeken - verwijder zo vroeg mogelijk viruszieke planten inclusief bol van het veld.
- Probeer zo snel mogelijk afstand te doen van TVX-besmette partijen.
- Gescheiden teelt van viruszieke partijen en gescheiden teelt van afbroei-partijen.

Voorkomen van verspreiding via tulpengalmijt

- Gescheiden bewaring van galmijt-besmette en verdachte partijen.
- Effectieve bestrijding van tulpengalmijt met Actellic of ULO.

Voorkomen van verspreiding via de bodem

- Vermijd zoveel mogelijk percelen waarop in het verleden TVX-geïnfecteerde partijen hebben gestaan.
- Met goed onkruidbeheer voorafgaand en tijdens de teelt wordt een potentieel virusreservoir verwijderd.
- Met goed onkruidbeheer tijdens en aansluitend de teelt van TVX-partijen wordt voorkomen dat er een (potentieel) virusreservoir ontstaat.

Voorkomen van mechanische verspreiding

- Werkvolgorde: bij alle werkzaamheden eerst gezond, daarna verdacht, als laatste ziek.
- Reinig machines, gereedschap en andere oppervlakten na gebruik met veel water (warm, eventueel met zeep) totdat alle gewas- en grondresten verdwenen zijn.
- Kop niet te laat en indien mogelijk bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding gering.

Voorkomen van verspreiding via bollen- en stromijt

- Bollenmijt en stromijt zijn niet of moeilijk met chemische middelen te bestrijden. Ruimtebehandeling met Actellic heeft geen effect. Bedrijfshygiëne is daarom erg belangrijk.
- Stro- en bollenmijten komen vaak voor op zure bollen. Wees daarom extra alert op zure bollen en bollenstof in een TVX-geïnfecteerde partij en ruim deze zo snel mogelijk op.

9 Referenties

- Alfaro-Fernández, A. Del Carmen Córdoba-Sellés, M., Herrera-Vásquez, J.A., Del Carmen Cebrián, M., Jordá, C. (2010) Transmission of Pepino mosaic virus by the Fungal Vector *Olpidium virulentus*. Journal of Phytopathology 158(4), 217–226.
- Asjes C.J., Blom-Barnhoorn G.J. 1998. Verspreiding Tulpenvirus X in tulpen - Nu meer bekend over de overbrenger. Bloembollencultuur 15. 18-19.
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475–483.
- Dees, M.W., Spetz, C., and Blystad, D.-R. (2011) First report of Tulip virus X (TVX) in Norway. ISHS Acta Horticulturae 901: XII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants.
- De Kock, M., Dees, R., Lemmers, M. en Martin, W. (2011) Verspreiding van Arabis-mozaïekvirus in tulp en andere bolgewassen. PT-rapport 12967.
- Herrera-Vásquez JA, Cebrián MC, Alfaro-Fernández A, Córdoba-Sellés MC, Jordá C. (2009) Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. Mycol. Res. 113:602–610.
- Kang S.G., Koo B.J., Lee E.T., Chang M.U. 2007. Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. J. Microbiol. Biotechnol. 17, 1833-1840.
- Kuwahara M. 1986. Resistance of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparede (Acarina, Acaridae), to insecticides. 1. Resistance patterns to organophosphorus insecticides. Japanese J. Appl. Entomol. Zool. 30, 290-295.
- Lommen S.T.E., Conijn C.G.M., Lemmers M.E.C., Pham. K.T.K and de Kock M.J.D. Mites as vector of Tulip Virus X in stored tulip bulbs. Bulletin IOBC/wprs Bulletin (in druk).
- Mowat W.P. (1982) Pathology and properties of Tulip virus X. Ann. Appl. Biol. 101(1), 51-63.
- Noge K., Mori N., Tanaka C., Nishida R., Tsuda M., Kuwahara Y. 2005. Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. Exp. Appl. Acarol. 35, 29-46.
- Stables L.M. 1984. Effect of pesticides on three species of *Tyrophagus* and detection of resistance to pirimiphos-methyl in *T. palmarum* and *T. putrescentiae*. In: Acarology VI, Volume 2, Griffiths D.A. and Bowman C.E. (eds), Ellis Horwood, Chichester. Pp. 1026–1033.
- Tzanetakis I.E., Mackey, I.C. and Martin R.R. (2005) Tulip Virus X (TVX) associated with lemon balm (*Melissa Officinalis*) Variegation: first report of TVX in the USA. Plant Pathol. 54(4), 562.
- Weber, R.W.S., and Webster, J. (2000) Teaching techniques for mycology: 9. *Olpidium* and *Rhizoglyphus* (Chytridiomycetes). Mycologist 14 (1), 17-20.
- Van Dijk P., Verbeek M., Bos L. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. Netherlands Journal of Plant Pathology 97, 381-399.
- Yamashita K., Sakai J., Hanada K. 1996. Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite-borne virus. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 62, 483-489.
- Yang B., Cai J.L., Cheng X.J. 2011. Identification of astigmatid mites using ITS2 and COI regions. Parasitol. Res. 108, 497-503.

10 Output

Vakbladartikel:

Bloembollenvisie 29 juli 2010 - Voorkomen van TVX - let ook op stromijt en perceelkeuze

Bloembollenvisie 30 juni 2011 - Waakzaamheid voor TVX geboden in teelt en verwerking:
voorkom vooral tulpengalmijt in bewaring

Lezingen:

Middelbaar Agrarisch Onderwijs Clusius: mei 2009 en maart 2011

Studieclub Bierum december 2009

Studieclub Schagen januari 2010

Open dag Zwaagdijk februari 2010

Open dagen:

Kennismiddagen PPO

- september 2009
- februari 2010
- september 2010
- februari 2011
- september 2011
- februari 2012

Posters/handouts: zie volgende pagina's



TVX: Nieuwe aanwijzingen over verspreiding

Maarten de Kock
e-mail: maarten.dekock@wur.nl

Introductie

Uit onderzoek eind jaren '90 kwam de tulpengalmijt als vector van Tulpenvirus X (TVX) maar voren. Ook is gebleken dat TVX via de kopmachine kan verspreiden. Echter, deze besmettingsroutes kunnen de toename van de TVX-problematiek niet volledig verklaren.

De laatste jaren zijn er verschillende aanwijzingen dat TVX ook via andere vectoren of op een manier zich kan verspreiden. Ondanks dat er nog weinig bewijs is, is het aan te bevelen om rekening te houden met deze aanwijzingen en elk risico op uitbreiding te beperken.

Mechanische verspreiding

- Mechanische verspreiding van TVX is tot nu toe alleen tijdens het koppen bestudeerd. Proeftuin Zwaagdijk en Agrifirm hebben aangetoond dat tijdens het ontbollen verspreiding van tulpenmozaïekvirus (TBV) plaats vindt. Het is zeer aannemelijk dat er ook verspreiding van TVX tijdens het ontbollen kan plaatsvinden.
- Het Toyama Agricultural Research Center heeft aangetoond dat er TVX-verspreiding plaats vindt wanneer gepelde bollen langs elkaar heen schuren.

Verspreiding voorkomen door ontsmetting

- Belangrijkste maatregel is het werken met virusvrije partijen of het strikt gescheiden televm verwerken en bewaren van virusgeïnfecteerde partijen.
- Machines, gereedschap en andere oppervlakten moeten na gebruik schoongespoten worden met (zo warm mogelijk) water en eventueel zeep totdat alle gewasresten verdwenen zijn.
- Aansluitend kan er een ontsmettingsmiddel als EasyClean of VirkonS worden toegepast. Middelen als formaline zijn niet werkzaam tegen virussen.

Verspreiding via andere mijten?

- Ondanks afwezigheid van tulpengalmijt werd er tijdens de bewaring verspreiding van TVX waargenomen. In éénjarige experimenten werd in 2008 gevonden dat ook de stromijt in staat was het TVX te verspreiden (met lage efficiëntie).

Verspreiding via water?

- Hosta Virus X (HVX) behoort net als TVX tot de familie van potexvirussen en veroorzaakt problemen in de teelt en export van Hosta. Het risico op verspreiding van HVX is het grootst tijdens het spoelen van Hosta-planten en de verspreiding kan relatief efficiënt plaatsvinden. Hierdoor is het vermoeden ontstaan dat TVX tijdens de waterbroei via wondjes op de prikbakken eenvoudig kan verspreiden en vooral bij nateelt verrassingen kan veroorzaken.

Verspreiding via grondgebonden vector?

- Vanuit onderzoeksinstituut Bioforsk (Noorwegen) is het bericht gekomen dat men TVX vanuit de bodem heeft geïsoleerd zonder dat in dat gebied tulp werd geteeld. Dit suggereert:
 - er virusoverdracht via nematoden of schimmels plaats kan vinden.
 - er een alternatieve waardplant is voor TVX waarin TVX zonder symptomen voorkomt.
 - omdat de symptomen van pseudo-Augusta overeen komen met agressieve TVX symptomen, het pseudo-Augustaziek mogelijk door TVX wordt veroorzaakt.

Onderzoek!

Het Productschap Tuin financiert in de periode 2009-2011 onderzoek naar deze manieren van verspreiding van TVX. Aansluitend kunnen doeltreffende maatregelen worden bedacht om de TVX-problematiek een halt toe te roepen. Op Open Dagen en in de vakbladen zal verslag worden gedaan.

Wat kan de praktijk ondertussen doen?

- Gescheiden teelt van virusvrije partijen, een goede bedrijfshygiëne en effectieve bestrijding van (tulpengal)mijt.
- Gescheiden nateelt van nabroei totdat bewezen is dat de nabroei-partij virusvrij is.
- Contact met PPO-BBF opnemen wanneer zich vreemde of onverklaarbare zaken voordoen omtrent TVX of andere virussen. Elke contact is vertrouwelijk. Alleen wanneer we met z'n allen dit probleem aanpakken, kan er een oplossing gevonden worden!



Tulpenvirus X – Steeds meer kennis en adviezen

Maarten de Kock, Miriam Lemmers & Suzanne Lommen
e-mail: maarten.dekock@wur.nl

Tulpenvirus X

De afgelopen jaren heeft onderzoek aan Tulpenvirus X (TVX) uitgewezen dat dit virus tijdens de bewaring door tulpengalmijt verspreid. Tevens is er tijdens het koppen en ontbollen een risico op verspreiding van dit virus. Recent onderzoek heeft aangetoond dat ook stromijt in staat is TVX te kunnen verspreiden en bollen een TVX-infectie vanuit de grond kunnen oplopen.

Verspreiding van TVX



Tijdens het koppen...



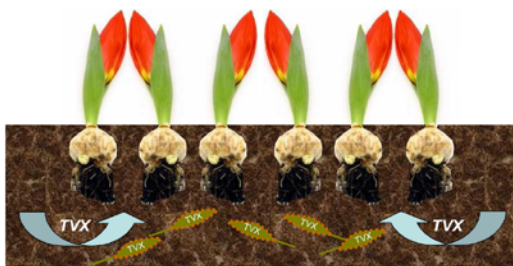
...en tijdens het ontbollen.



Door tulpengalmijt...
(*Aceria tulipae*)



...maar ook door stromijt.
(*Tyrophagus*-soorten)



Tulpen kunnen een TVX-infectie vanuit de grond oplopen wanneer daarin TVX-geïnfecteerde plantresten aanwezig zijn.

Bedrijfshygiëne

- Werk met getoetst virusvrije partijen.
- Controleer bij aankoop of de partij echt vrij is van virus.
- Gescheiden teelt van virusziek en gezond.
- Probeer zo snel mogelijk afstand te doen van TVX-besmette partijen.
- Ziekzoeken: verwijder zo vroeg mogelijk viruszieke planten inclusief bol van het veld.
- Reinig machines, gereedschap en andere oppervlakten na gebruik met veel water (warm, eventueel met zeep) totdat alle gewas- en grondresten verdwenen zijn.
- Er zijn een aantal middelen die virus op gereedschap, machines en werkkoppervlakken kunnen afdoden. Let op: middelen als formaline en alcohol zijn niet werkzaam tegen virussen.

Voorkomen van mechanische verspreiding

- Eerst virusvrije partijen koppen/klepelen/ontbollen.
- Kop niet te laat, het gewas is dan extra vatbaar voor mechanische verspreiding van het virus.
- Kop indien mogelijk bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding gering.
- Door het bevochtigen van het ontbolmes met magere melk, zou verspreiding van TVX te beperken zijn.
- Gescheiden teelt van afbroei gedurende één teeltseizoen.

Voorkomen van verspreiding via mijten

- Gescheiden bewaring van TVX-geïnfecteerde partijen.
- Effectieve bestrijding van tulpengalmijt via Actellic of ULO is daarom essentieel.
- Stromijt is niet of moeilijk met chemische middelen te bestrijden; bedrijfshygiëne is daarom erg belangrijk.
- Let op dat nergens in de bewaarruimten stof met stromijten kan ophopen.
- Stromijt komt vaak voor op zure bollen. Wees daarom extra alert op zuren bollen in een TVX-geïnfecteerde partij en ruim deze zo snel mogelijk op.

Voorkomen van verspreiding via de grond

- Vermijd zoveel mogelijk percelen waarop TVX-geïnfecteerde partijen hebben gestaan.



Tulpenvirus X – Steeds meer kennis en adviezen

Maarten de Kock, Suzanne Lommen & Miriam Lemmers
e-mail: maarten.dekock@wur.nl

versie: februari 2012

Onderzoek aan Tulpenvirus X

Sinds de ontdekking van Tulpenvirus X doet de tulpensector moeite dit virus te beheersen. Gedetailleerd onderzoek laat een steeds complexere wijze van virusverspreiding zien. Deze kennis heeft echter ook geleid tot een breed scala aan maatregelen om infectie en verspreiding steeds beter te voorkomen.

Alternatieve waardplanten voor TVX

Naast tulp kan TVX (misschien wel van nature) ook voorkomen in andere gewassen. Tot nu toe is TVX gevonden in:

- Kleine brandnetel
- Melganzevoet
- Vogelmuur

Verspreiding van TVX

Sterke verspreiding (tientallen procenten toename):

- Via tulpengalmijt
- Bodemgebonden verspreiding (er wordt onderzoek gedaan naar eventuele betrokkenheid van een vector)

Geringe verspreiding (max. enkele procenten toename):

- Mechanische verspreiding tijdens koppen, pellen, spoelen, waterbroei op prikbakken en ontbollen
- Via bollenmijt & stromijt



Visuele symptomen van TVX op het blad en de bloem.

Beheersing van Tulpenvirus X

Virusbron aanpakken door bedrijfshygiëne

- Werk met getoetst virusvrije partijen.
- Ziekzoeken - verwijder zo vroeg mogelijk viruszieke planten inclusief bol van het veld.
- Probeer zo snel mogelijk afstand te doen van TVX-besmette partijen.
- Gescheiden teelt van viruszieke partijen en afbroei.

Voorkomen van verspreiding via tulpengalmijt

- Gescheiden bewaring van galmijt-besmette en verdachte partijen.
- Effectieve bestrijding van tulpengalmijt met Actellic of ULO.

Voorkomen van verspreiding via de bodem

- Vermijd zoveel mogelijk percelen waarop in het verleden TVX-geïnfecteerde partijen hebben gestaan.
- Met goed onkruidbeheer voorafgaand en tijdens de teelt wordt een potentieel virusreservoir verwijderd.
- Met goed onkruidbeheer tijdens en aansluitend de teelt van TVX-partijen wordt voorkomen dat er een (potentieel) virusreservoir ontstaat.

Voorkomen van mechanische verspreiding

- Werkvolgorde: bij alle werkzaamheden eerst gezond, daarna verdacht, als laatste ziek.
- Reinig machines, gereedschap en andere oppervlakten na gebruik met veel water (warm, eventueel met zeep) totdat alle gewas- en grondresten verdwenen zijn.
- Kop niet te laat en indien mogelijk bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding gering.

Voorkomen van verspreiding via bollen- en stromijt

- Bollenmijt en stromijt zijn niet of moeilijk met chemische middelen te bestrijden. Ruimtebehandeling met Actellic heeft geen effect. Bedrijfshygiëne is daarom erg belangrijk.
- Stro- en bollenmijten komen vaak voor op zure bollen. Wees daarom extra alert op zure bollen en bollenstof in een TVX-geïnfecteerde partij en ruim deze zo snel mogelijk op.

