

Zaadoverdracht van het Strawberry latent ringspot virus in lelie

Eindrapportage onderdeel zaadoverdracht van het onderzoek naar
verspreidingsroutes van SLRSV in lelie

Martin Verbeek, Ineke Stijger, Miriam Lemmers

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

PPO nr. 3736181700

© 2016 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO. Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

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



Projectnummer: 3736181700
Projectnummer PT: 15073

Productschap  **Tuinbouw**

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

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel. : +31 (0) 252 46 21 21
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING	7
1.1 Strawberry latent ringspot virus (SLRSV).....	7
1.2 Doel van dit onderzoek.....	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
2.1 ELISA.....	9
2.2 RT-PCR	9
2.3 Lelie-materiaal	9
2.4 Detectie van SLRSV in zaailingen.....	9
2.5 Lokalisatie SLRSV in zaad.....	10
3 RESULTATEN	11
3.1 Verificatie detectiemethoden.....	11
3.2 Detectie van SLRSV in zaailingen.....	11
3.3 Detectie van SLRSV in stuifmeel.....	13
3.4 Lokalisatie SLRSV in zaad.....	14
4 CONCLUSIES	15
BIJLAGE 1: DAS-ELISA PROTOCOL PRIME DIAGNOSTICS	17
BIJLAGE 2: REACTIEMIX EN PROGRAMMA RT-PCR	19
BIJLAGE 3: COMMUNICATIE: POSTER13TH INTERNATIONAL PLANT VIRUS EPIDEMIOLOGY SYMPOSIUM, AVIGNON, FRANCE.	20

Samenvatting

Het *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, in het Nederlands *Latent aardbeikringvlekkenvirus*) komt in een groot aantal gewassen voor, waaronder o.a. aardbei, framboos, bessenstruiken, verschillende fruitbomen (kers, pruim, perzik), groenten en kruiden (asperge, selderij, peterselie) en siergewassen (roos, lelie en narcis). Binnen de EU is dit virus een quarantaine organisme in plantmateriaal van aardbei, braam en framboos. In andere delen van de wereld is SLRSV ook een quarantaine organisme in andere gewassen, voor de export van lelie naar o.a. China en de Verenigde Staten geldt een 0-tolerantie.

SLRSV wordt overgebracht door een tweetal aaltjes-soorten: *Xiphinema diversicaudatum* en *X. coxi*. Er zijn echter vermoedens dat dit virus ook op andere manieren verspreid kan worden dan alleen door de twee genoemde *Xiphinema*-soorten. Er is namelijk overdracht waargenomen in teelten waarin geen *Xiphinema* is waargenomen. De vraag is dus op welke manieren SLRSV kan worden verspreid. In de literatuur is al gerapporteerd dat SLRSV in een hoog percentage (~70%) met zaad over kan gaan in bijvoorbeeld selderij, munt en braam. Van zaadoverdracht in het gewas lelie is tot op heden nog niets bekend. Bovendien kan het virus zeer algemeen voorkomende onkruiden als herderstasje en muur infecteren.

Het doel van het onderzoek waarover in dit verslag wordt gerapporteerd was het nagaan of de verspreiding van SLRSV in lelie al dan niet via zaadoverdracht kan plaatsvinden. Hiervoor werden experimenten uitgevoerd met een vijftal leliecultivars die via zaad worden vermeerderd. SLRSV kon bij deze cultivars in het zaad, het stuifmeel en in nieuwe zaailingen worden aangetoond.

SLRSV kon zo in hoge mate worden aangetoond in zaden afkomstig uit partijen met een zeker percentage SLRSV. Bij één cultivar werd een percentage van 30% infectie gevonden in zaailingen die waren gegroeid uit zaad uit een besmette partij.

Het virus kon ook worden aangetoond in het stuifmeel van geïnfecteerde bloemen. De vraag of het virus ook via stuifmeel kan worden overgedragen van de ene plant naar de andere plant wordt op moment van deze rapportage nog onderzocht in een project gefinancierd door iBulb.

Sommige zaad-overgedragen virussen verblijven voornamelijk aan de buitenkant van het zaad (op of in de zaadhuid) en infecteren het nageslacht pas wanneer de kiemplant door de zaadhuid heen breekt (bijvoorbeeld potexvirussen en tobamovirussen). Bij dit soort virussen is een zaadontsmetting nog een mogelijkheid om infectie van de jonge kiemplantjes te voorkomen. In het onderzoek waarover hier wordt gerapporteerd is naar voren gekomen dat SLRSV tot een andere categorie virussen behoort, namelijk de virussen die zaadoverdraagbaar zijn en daarbij al in het zaad in endosperm en zelfs het embryo aanwezig zijn. Voor deze groep virussen is zaadontsmetting geen remedie tegen zaadoverdracht.

Samengevat heeft dit onderzoek de volgende nieuwe inzichten opgeleverd:

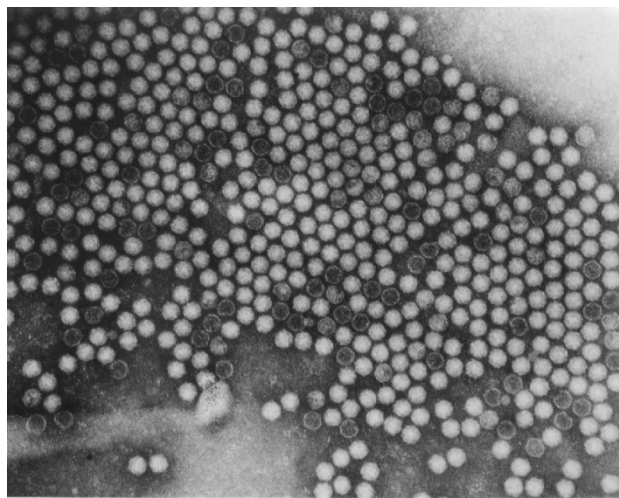
- SLRSV is zaadoverdraagbaar in lelie
- SLRSV is aantoonbaar in endosperm en embryo van leliezaad. Zaadontsmetting is geen optie om zaadoverdracht te voorkomen.

1 Inleiding en probleemstelling

1.1 Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)

Het *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, in het Nederlands *Latent aardbeikringvlekkenvirus*) kan in een grote verscheidenheid aan gewassen voorkomen. Het virus werd gevonden in o.a. aardbei, framboos, bessenstruiken, verschillende fruitbomen (kers, pruim, perzik), groenten en kruiden (asperge, selderij, peterselie) en siergewassen (roos, lelie en narcis). Binnen de EU is dit virus een quarantaine organisme in plantmateriaal van aardbei, braam en framboos. In andere delen van de wereld is SLRSV ook een quarantaine organisme in andere gewassen.

Vanwege de overdracht door een tweetal aaltjes-soorten (*Xiphinema diversicaudatum* en *X. coxi*) werd SLRSV eerst ingedeeld in het geslacht *Nepovirus*. Echter, andere eigenschappen van het virus waren aanleiding om SLRSV taxonomisch toch apart van de nepovirussen in te delen (en is dus tot op heden alleen ondergebracht in de familie *Secoviridae* en niet in een bepaald geslacht (genus)).



Figuur 1: elektronenmicroscopische opname van deeltjes van het Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)

Er zijn vermoedens dat SLRSV ook op andere manieren verspreid kan worden dan alleen door de twee genoemde *Xiphinema*-soorten. Er is namelijk overdracht waargenomen in teelten waarin geen *Xiphinema* is waargenomen. De vraag is dus op welke manieren SLRSV kan worden verspreid. In de literatuur is al gerapporteerd dat SLRSV in een hoog percentage (~70%) met zaad over kan gaan in bijvoorbeeld selderij, munt en braam. Van zaadoverdracht in het gewas lelie is tot op heden nog niets bekend. Bovendien kan het virus zeer algemeen voorkomende onkruiden als herderstasje en muur infecteren.

SLRSV is een belangrijk virus voor de export van leliebollen, omdat voor dit quarantainevirus in o.a. China en de VS een 0-tolerantie geldt.

Er worden in de praktijk regelmatig onverklaarbare (toenames van) besmettingspercentages waargenomen. Voor het toetsen van (export)materiaal is een goed gevalideerde ELISA toets beschikbaar. Inmiddels is gebleken dat in lelie veel genetische varianten van SLRSV voorkomen, waardoor het op dit moment nog niet mogelijk is om RT-PCR of TaqMan in te zetten voor het toetsen van lelie op dit virus. De BKD en Wageningen UR doen op dit moment onderzoek naar de genetische variatie van SLRSV isolaten in lelie en wat het effect daarvan is op de gevoeligheid van de huidige toetsmethoden.

1.2 Doel van dit onderzoek

Het doel van dit onderzoek is het nagaan of de verspreiding van SLRSV in lelie al dan niet via zaadoverdracht kan plaatsvinden.

2 Materiaal en methoden

2.1 ELISA

Voor SLRSV is een door de NVWA gevalideerde, en door de BKD gebruikte, ELISA-methode voorhanden bij Prime Diagnostics (Wageningen). Deze Double-Antibody-Sandwich (DAS)-ELISA is uitgevoerd volgens het protocol van Prime Diagnostics (zie http://www.wageningenur.nl/upload_mm/7/f/6/6646e2f2-078a-4d16-9c77-3f2c760bc304_protocol%20DAS-ELISA.pdf).

2.2 RT-PCR

De genoomsequenties van SLRSV isolaten in lelie zijn erg variabel. Het is daarom moeilijk om een generieke PCR te ontwerpen waarmee alle SLRSV-isolaten aangetoond kunnen worden. Voor dit project zijn voor enkele van de in dit onderzoek gebruikte SLRSV isolaten afzonderlijke specifieke PCR-primers ontworpen m.b.v. CLC Main Workbench software (CLC Bio, Aarhus, Denemarken). De RT-PCR werd uitgevoerd met de Promega Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI USA) volgens het PCR programma in Bijlage 1. Amplicons werden geanalyseerd met behulp van agarose gel-electrophorese en kleuring met Gel-Red (Biotium, Hayward, CA USA).

2.3 Lelie-materiaal

Op een bedrijf waar tuinlelies worden veredeld zijn planten van 5 cultivars verzameld, in dit verslag aangeduid met cultivar A t/m E. De partijen van deze cultivars hebben verschillende percentages van SLRSV zoals eerder bepaald in een bladtoets uitgevoerd door BQ support (Lisse).

Tabel 1: overzicht percentages SLRSV in de partijen van de verschillende cultivars

Lelie cultivar	% SLRSV in partij
A	0
B	0,4-0,8
C	12-24
D	56-58
E	12-41

Van deze planten zijn zowel blad als bloemen en stuifmeel verzameld en getoetst in ELISA. Van 5 planten per cultivar zijn in een later stadium zaaddozen en bollen verzameld. Materialen werden bij 4°C opgeslagen.

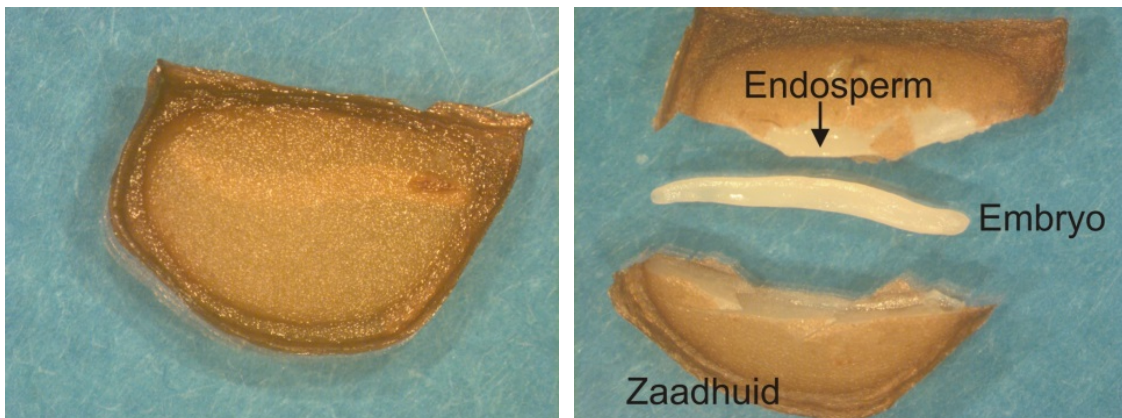
2.4 Detectie van SLRSV in zaailingen

De verzamelde zaaddozen van cultivar A t/m E zijn twee maanden bewaard bij 4°C voor rustdoorbreking. Daarna zijn de zaden uit de zaaddozen gehaald en in zaaibakjes met gestoomde grond uitgezaaid. De zaaibakjes werden in een insectenvrije kas bij 20°C weggezet. Na uitgroei van de zaden tot zaailingen van ongeveer 10 cm hoog werden per cultivar ongeveer 100 kiemplantjes bemonsterd. Deze plantjes werden individueel vernalen met een Pollähne pers in SEB (sample extractiebuffer, zie voor de samenstelling het protocol van Prime Diagnostics) en getoetst m.b.v. DAS-ELISA. Voor een klein aantal monsters werd een verificatie RT-PCR uitgevoerd om na te gaan of de DAS-ELISA gevoelig genoeg was om alle geïnfecteerde planten te detecteren (figuur 3).

2.5 Lokalisatie SLRSV in zaad

Leliezaden van cultivar D werden eerst overnacht geweekt in water. Daarna werden de zaden overlangs met een scalpel doorgesneden, met het snijvlak net naast het embryo. Het embryo is vaak zichtbaar in het half-doorschijnende zaadje (fig. 2, links). Door enige druk te zetten naast het embryo kan dit voorzichtig tussen het endosperm vandaan worden geduwd. Met een pincet kan dan het embryo uit het zaad worden gehaald zonder dat dit in contact komt met de zaadhuid en eventueel gecontamineerd kan worden met virus dat zich in of op de zaadhuid bevindt (fig. 2, rechts).

De verschillende onderdelen van het zaad werden met RT-PCR getoetst op aanwezigheid van SLRSV. Hiervoor werden eerst de verschillende zaadonderdelen vermalen in 50 µl Milli-Q water. Daaruit werd het RNA geëxtraheerd met een RNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Duitsland) volgens het bijgeleverde protocol. De RNA-extracten werden verder gebruikt in de RT-PCR zoals beschreven in 2.2.



Figuur 2: Links leliezaad, met het doorschijnende embryo zichtbaar. Rechts een zaadje waarbij het embryo is vrijgeprepareerd.

3 Resultaten

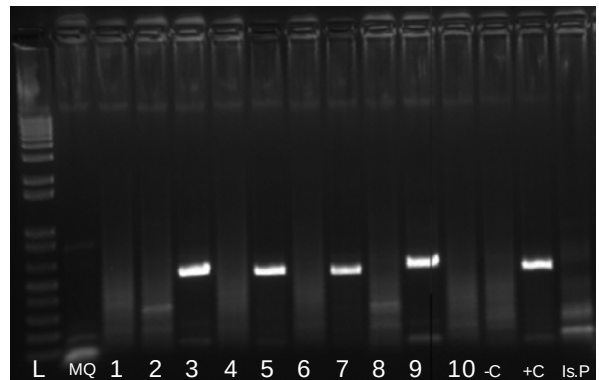
3.1 Verificatie detectiemethoden

De twee gebruikte detectiemethoden in dit onderzoek zijn gebaseerd op serologie (met antilichamen) en de moleculaire biologie (op de genetische samenstelling). Als serologische methode wordt DAS-ELISA gebruikt met een antiserum dat tegen een SLRSV isolaat is gemaakt uit een ander gewas dan lelie. Deze DAS-ELISA is robuust omdat het vele verschillende isolaten kan aantonen, maar hier moet wel bij worden opgemerkt dat een aantal lelie-isolaten heel zwak met dit antiserum kunnen reageren. Hiermee wordt bij de toetsingen op de BKD rekening gehouden.

Binnen dit project was het noodzakelijk om met zekerheid ook kleine hoeveelheden virus in stuifmeel en zaad(onderdelen) te kunnen detecteren. Daarom is voor een paar isolaten die binnen dit onderzoek werden gebruikt een specifieke RT-PCR ontwikkeld. Dit wil zeggen dat er per isolaat een bepaalde primercombinatie is ontworpen waarmee dat bewuste isolaat goed kan worden aangetoond. De primers zijn meestal niet geschikt om andere isolaten te detecteren, dit in verband met de hoge mate van variabiliteit in het genomisch RNA van het virus.

In figuur 3 is een vergelijking van beide methoden weergegeven in een toets op 10 zaailingen van cultivar D. De resultaten van beide experimenten komen volledig overeen, wat betreft de aantoonbaarheid van positieve monsters, maar ook wat betreft de afwezigheid van vals positieven en vals negatieven (betrouwbaarheid).

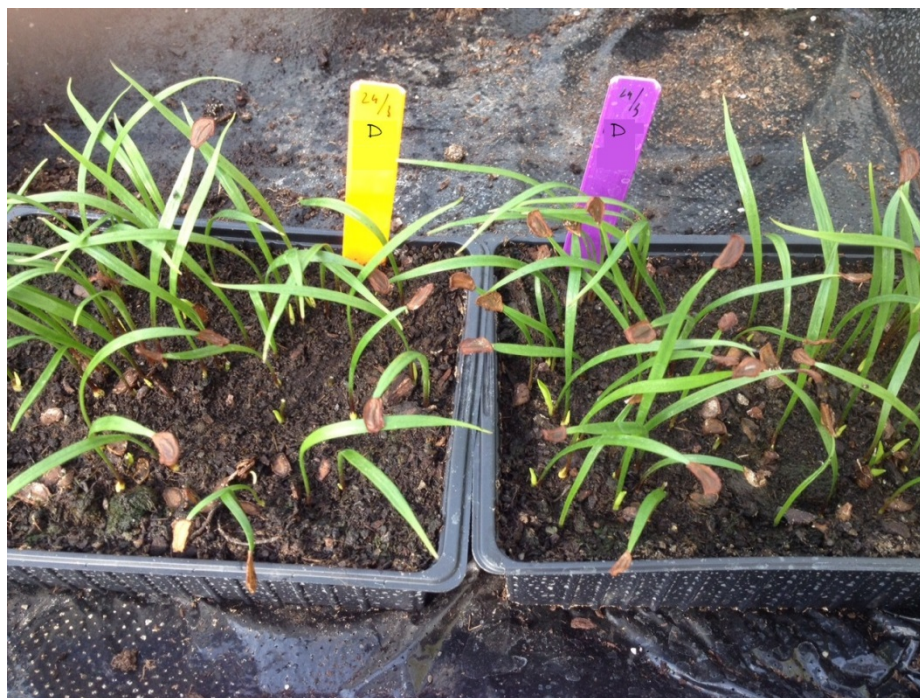
zaailing 1	0.00	Lelie gezond	0.00
zaailing 2	0.00	Pos controle (SLRSV-)	3.67
zaailing 3	0.50		
zaailing 4	0.00		
zaailing 5	0.36		
zaailing 6	0.00		
zaailing 7	0.47		
zaailing 8	0.00		
zaailing 9	0.35		
zaailing 10	0.00		



Figuur 3: vergelijking DAS-ELISA en RT-PCR voor een SLRSV isolaat uit cultivar D. Getoetst zijn 10 zaailingen (in beide figuren 1 t/m 10). Als negatieve controle is gezond lelieblad en als positieve controle geïnfecteerd blad van cultivar D meegenomen. In de RT-PCR is nog een ander SLRSV isolaat meegenomen (Is.P), dat niet wordt herkend door de specifieke primers voor het SLRSV isolaat uit cultivar D. Isolaat Is.P is ook als positieve controle in de DAS-ELISA gebruikt en geeft een ongeveer 10x hogere ELISA-waarde dan het lelie-isolaat.

3.2 Detectie van SLRSV in zaailingen

De leliezaden, die na een koudeperiode van twee maanden (rustdoorbreking) werden uitgezaaid, kiemden voor bijna alle cultivars voorspoedig (vrijwel 100% kieming), echter voor cultivar E gold dit helaas niet. Voor deze cultivar werd geen kieming van het zaad verkregen. Voor de andere 4 cultivars zijn, in het stadium waarbij het tweede blaadje verscheen (1 maand na zaaien), de plantjes geoogst en individueel getoetst m.b.v. DAS-ELISA (zie figuur 4).



Figuur 4: stadium van toetsing leliezaailingen cultivar D.

Cultivar D (A405 na 2h)											
monster	ELISA	monster	ELISA	monster	ELISA	monster	ELISA	monster	ELISA	monster	ELISA
1	0.40	11	0.01	21	0.00	31	0.00	41	0.42	Lelie gezond	0.01
2	0.41	12	0.39	22	0.00	32	0.00	42	0.00	Lelie gezond	0.01
3	0.28	13	0.00	23	0.01	33	0.45	43	0.00	Pos controle	0.48
4	0.02	14	0.00	24	0.00	34	0.42	44	0.43		
5	0.42	15	0.38	25	0.01	35	0.03	45	0.01		
6	0.41	16	0.38	26	0.01	36	0.00	46	0.01		
7	0.03	17	0.00	27	0.00	37	0.39	47	0.01		
8	0.01	18	0.39	28	0.00	38	0.00	48	0.01		
9	0.00	19	0.44	29	0.38	39	0.38	49	0.00		
10	0.40	20	0.01	30	0.00	40	0.02	50	0.00		
1	-0.01	11	0.01	21	0.30	31	0.00	41	0.00	51	0.36
2	0.00	12	0.00	22	0.03	32	0.46	42	0.01	52	0.01
3	0.00	13	0.44	23	0.00	33	0.01	43	0.00	53	0.21
4	0.00	14	0.03	24	0.01	34	0.00	44	0.02	54	0.02
5	0.00	15	0.00	25	-0.01	35	0.00	45	0.00	55	0.37
6	0.00	16	-0.01	26	0.00	36	0.46	46	0.03	Lelie gezond	0.00
7	0.48	17	0.00	27	0.00	37	0.02	47	0.00	Lelie gezond	0.00
8	0.01	18	0.00	28	-0.01	38	0.00	48	0.01	Pos. controle	0.49
9	0.19	19	-0.01	29	0.00	39	0.00	49	0.00		
10	0.32	20	0.00	30	0.53	40	0.00	50	0.38		
Percentage SLRSV in zaailingen van cultivar D: 34 / 115 = 30%											

Figuur 5: uitslag DAS-ELISA op 105 zaailingen van cultivar D

Tabel 2: percentage SLRSV-zieke zaailingen van 4 cultivars (cultivar E niet gekiemd).

Lelie cultivar	% SLRSV in partij	% SLRSV in ~100 zaailingen
A	0	0
B	0,4-0,8	6
C	12-24	28
D	56-58	30
E	12-41	Niet getest

3.3 Detectie van SLRSV in stuifmeel

Als SLRSV via het zaad kan worden overgedragen is het waarschijnlijk dat het virus via de 'moederplant' in het zaad is gekomen, dus via de plant waaraan de zaaddoos is gegroeid. Sommige virussen kunnen echter ook vanuit de 'vaderplant' worden overgedragen, met andere woorden via stuifmeeloverdracht. Binnen dit project is getoetst of SLRSV überhaupt in stuifmeel van geïnfecteerde planten voorkomt. Om aan te tonen dat overdracht ook daadwerkelijk via stuifmeel mogelijk is, worden daarvoor experimenten uitgevoerd in een door iBulb gefinancierd project.

Van enkele bloemen van elk van de vijf leliecultivars A t/m E werd stuifmeel verzameld. Dit werd voorzichtig met een wattenstokje van de antheren afgeschraapt. Daarnaast werden ook helmhokjes (antheren) en de hele helmdraden incl. helmhokjes verzameld. Deze monsters werden in een glazen mortiertje zeer fijn gemalen in SEB (sample extractiebuffer) en verwerkt tot ELISA monsters. De DAS-ELISA werd verder uitgevoerd zoals beschreven in 2.1.

Cultivar	Stuifmeel	Antheer	Hele helmdraad
A	0.01	0.01	0.01
B	0.00	0.01	0.01
C	0.00	0.01	0.50
D	0.52	0.47	0.54
E	0.58	0.59	0.55
PC (SLRSV niet uit lelie)	3.60		

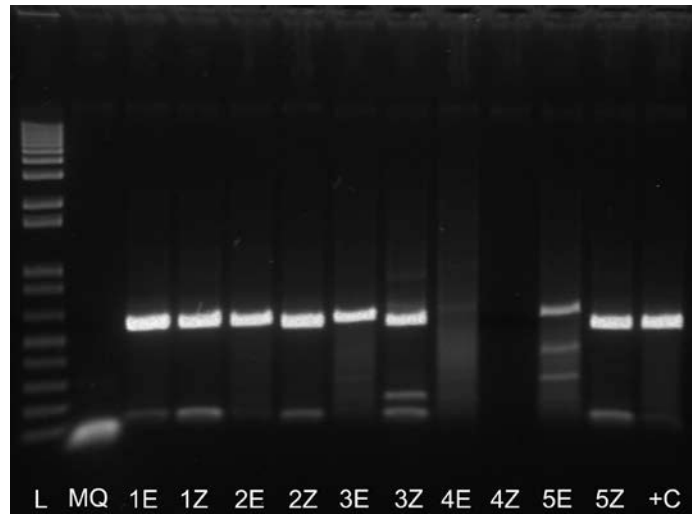
Figuur 6: ELISA uitslagen van stuifmeel, antheren en hele helmdraden per cultivar.

In het stuifmeel van cultivars D en E kon SLRSV goed worden aangetoond. Daarbij kon het virus ook in de helmdraden van cultivar C worden aangetoond. Dit wil niet zeggen dat SLRSV bij cultivar C niet in het stuifmeel voorkomt, maar het stuifmeel en de hele helmdraad zijn van verschillende bloemen verzameld. Bij rassen waarbij een laag percentage SLRSV in de partij voorkomt is de kans dat er stuifmeel is verzameld van gezonde bloemen aanzienlijk.

3.4 Lokalisatie SLRSV in zaad

Dit onderzoek is alleen uitgevoerd met zaden van cultivar D vanwege de hogere kans op SLRSV-geïnfecteerde zaden. De verschillende onderdelen van de zaden werden gedissecteed en opgewerkt tot RNA-monsters zoals beschreven is in 2.5. Op deze monsters werd een RT-PCR uitgevoerd met – voor het SLRSV isolaat uit cultivar D – specifieke primers.

Na RT-PCR op 5 gedissecteerde zaden van cultivar D bleken 4 van de 5 zaden geïnfecteerd te zijn met SLRSV.



Figuur 7: Uitslag RT-PCR (na gel-electrophorese) van de embryo's (E) en zaadhuid + endosperm (Z) van 5 zaden (1 t/m 5). De positieve control (+C) is RNA geëxtraheerd uit blad van cultivar D.

4 Conclusies

Het *Latent aardbeienkringvlekkenvirus* of *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) infecteert naast vele andere gewassen (zowel dicotyl als monocotyl) ook lelie. Naast de al bekende verspreidingsroute via nematoden en zaadoverdracht in bepaalde onkruiden, is in dit project aangetoond dat ook in lelie de verspreidingsroute via zaad van belang is. Met deze verspreidingsroute moet terdege rekening worden gehouden tijdens de veredeling van lelie en de vermeerdering van zogenaamde tuinlilies, die voornamelijk via zaad worden vermeerderd.

SLRSV kon in hoge mate worden aangetoond in zaden afkomstig uit partijen met een zeker percentage SLRSV. Bij één cultivar werd een percentage van 30% infectie gevonden in zaailingen die waren gegroeid uit zaad van een SLRSV-besmette partij.

Het virus kon ook worden aangetoond in het stuifmeel van geïnfecteerde bloemen. De vraag of het virus ook via stuifmeel kan worden overgedragen van de ene plant naar de andere plant wordt op moment van deze rapportage nog onderzocht.

Sommige zaad-overgedragen virussen verblijven voornamelijk aan de buitenkant van het zaad (op of in de zaadhuid) en infecteren het nageslacht pas wanneer de kiemplant door de zaadhuid heen breekt (dit is bijvoorbeeld het geval bij potexvirussen en tobamovirussen). Bij dit soort virussen is een zaadontsmetting nog een mogelijkheid om infectie van de jonge kiemplantjes te voorkomen. In het onderzoek waarover hier wordt gerapporteerd is naar voren gekomen dat SLRSV tot een andere categorie virussen behoort, namelijk de virussen die zaadoverdraagbaar zijn en daarbij al in het zaad in endosperm en zelfs het embryo aanwezig zijn. Voor deze groep virussen is zaadontsmetting geen remedie tegen zaadoverdracht.

Samengevat heeft dit onderzoek de volgende nieuwe inzichten opgeleverd:

- SLRSV is zaadoverdraagbaar in lelie
- SLRSV is aantoonbaar in endosperm en embryo van leliezaad. Zaadontsmetting is geen optie om zaadoverdracht te voorkomen.

Van deze bevindingen zijn de Nederlandse veredelaars in een schrijven vanuit Anthos op de hoogte gebracht (juni 2015).

Bijlage 1: DAS-ELISA protocol Prime Diagnostics

primediagnosics

Protocol

Double antibody sandwich (DAS) ELISA

Our reagents are optimized for use in DAS-ELISA using certified NUNC-Immuno Plates Maxisorp F96 and operating with a working volume of 200 µl per well.

The incubations are performed in a tightly closed humid box. During incubation the plates are covered with a lid or tape.

For washing: empty the wells and soak the wells 15 seconds with washing buffer while shaking.

Repeat this 3 – 5 times. Remove any liquid by blotting the plates on paper towels.

Buffers and chemicals:

- Coating buffer: 1.59 gr Na_2CO_3 , 2.94 gr NaHCO_3 , pH 9.6
Add demineralized water to 1000 ml total volume.
- PBS 0.01 M: 8.18 gr NaCl, 0.15 gr KCl, 0.27 gr KH_2PO_4 ,
1.42 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7.4.
Add demineralized water to 1000 ml total volume.
- Washing buffer (PBST): 0.05 % Tween-20 in PBS 0.01 M
- Extraction buffer (SEB): 0.2% egg ovalbumine (grade II), 2% PVP40,
0.05% Tween-20 and 0.05% NaN_3 in PBS 0.01 M
- Substrate buffer: 97 ml diethanolamine, pH 9.8
Add demineralized water to 1000 ml total volume.
- Substrate: 15 mg paranitrophenylphosphate (pNPP) in 20 ml substrate
buffer

Procedure:

	Incubation buffer	Incubation time and temperature	Concentration of reagent
1. Coating	Coating buffer	Overnight at 4°C or 3h at 37°C	1000x diluted coating antibody
2. Controls and samples	Extraction buffer	Overnight at 4°C	10x diluted positive control
3. Conjugate	Extraction buffer	Overnight at 4°C or 3h at 37°C	1000x diluted AP-conjugate
4. Substrate	Substrate buffer	30 minutes at room temperature	0.75 mg/ml pNPP

Sample preparation:

Prepare a sample extract in an appropriate buffer and test the extract without further dilution. It is recommended to test a 10 times dilution of the extract as well.

We recommend using negative controls existing of healthy plant extracts originating from the appropriate host of the pathogen as well as an internal control existing of SEB.

The positive control produced by Prime Diagnostics is a qualitative control and can be used as an internal control for the assay only. We recommend using an in-house positive control as well.

Remarks:

- A sample is positive if the ratio ($\text{OD}_{405} \text{ sample} / \text{OD}_{405} \text{ healthy plant extract}$) is at least 2.
- The use of other dilutions for the reagents will cause differences in reactivity, specificity, selectivity and detection limits.
- Lower reaction volumes will cause higher detection levels and lower ratio's.
- Different incubation times and temperatures will cause differences in sensitivity and background reactions.
- If the buffers are to be stored for more than 1 week it is recommendable to add Sodium Azide in a final concentration of 0.05%.

Plant Research International

Prime Diagnostics

PO Box 69, NL-6700 AB Wageningen, The Netherlands

Telephone: +31 (0)317 480 613 Fax: +31 (0)317 481 007

E-mail: primediagnosics@wur.nl

Website: www.primediagnosics.com

Bijlage 2: Reactiemix en programma RT-PCR

	<i>Pipeteerschema Promega Access RT-PCR system</i>		
	5 x AMV buffer	5	
	dNTP	0.5	
	MgSO ₄	1	
	fw primer (10 uM)	1	
	rv primer (10 uM)	1	
	AMV	0.5	
	Tfl Taq	0.5	
	MQ	14.5	
	RNA template	1	
	Totaal reactievolume	25	
	RT-PCR reactie:		
	45'	48C	
	2'	94C	
	30"	94C	
	1'	50C	
	1'	68C	
	6'	68C	
	hold	4C	

Bijlage 3: Communicatie: poster 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium, Avignon, France.

**WAGENINGEN UR**
For quality of life



Strawberry latent ringspot virus in Lily is seed transmitted and localised in the embryo

Martin Verbeek & Ineke Stijger

Background

Strawberry latent ringspot virus (SLRSV, family *Secoviridae*, not assigned to a genus) has a very broad host range in both dicotyledons and monocotyledons. One of its hosts is Lily (*Lilium* spp.) in which SLRSV does not cause symptoms. However, SLRSV causes economic losses in Lily as infected bulbs cannot be exported to certain countries due to phytosanitary legislations.

Early work on SLRSV in vegetable crops revealed the nematodes *Xiphinema diversicaudatum* and *X. coxi* as vectors (Lister, 1964; Murrant, 1974). Seed transmission was reported as well in the crops Raspberry, Celery and Mentha, and in weeds such as Henbit dead-nettle (*Lamium amplexicaule*), Chickweed (*Stellaria media*) and Goosefoot (*Chenopodium quinoa*) (Murrant, 1974).

The objective of our research was to determine whether SLRSV is seed-transmitted in cultivated Lily.

Methods

Experiments were set-up with two SLRSV-infected Lily cultivars which are known as 'Garden Lilies' and are normally propagated by seed. Seed pods were harvested from SLRSV-infected plants, and from a non-infected control plant, dried and kept at 4°C for several months in order to break dormancy. Individual seeds were tested in DAS-ELISA and RT-PCR for the presence of SLRSV. Seeds were also sown in sterilised soil for growing-out tests. In order to localise the virus in the seeds, seeds were dissected. Seed coat + endosperm and embryo were tested for SLRSV separately with RT-PCR.



Figure 1. Lily seeds were sown for individual testing of seedlings for presence of SLRSV



Figure 2. Dissection of Lily seeds for separate testing of embryo's and endosperm + seed coat



Results

Growing-out test

In a number of individual seeds SLRSV was detected using DAS-ELISA. These results were confirmed by RT-PCR using specific primers for the SLRSV isolate present in the research material.

In the sowing-out test, up to 30% of the young seedlings turned out to be infected.

Localisation of SLRSV in seed

- SLRSV was detected by RT-PCR in both parts of the dissected seeds, i.e. the embryo and the rest of the seed comprised of seed coat and endosperm.

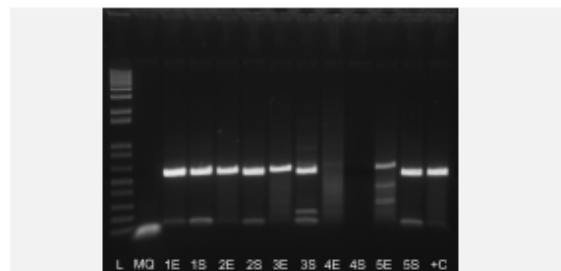


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons after SLRSV-specific RT-PCR on embryo's (E) and the rest of the seed (S) of 5 seeds of an SLRSV infected plant of Garden Lily

Conclusions

- From our experiments it can be concluded that SLRSV is seed transmitted in Garden Lily.
- SLRSV could be detected within both endosperm and the embryo of the infected seed. This means that seed-disinfection methods are not applicable to SLRSV-infected seeds.

References

- Lister, R. M., 1964. Strawberry latent ringspot: A new nematode-borne virus. *Ann. Appl. Biol.* 54:167-176
Murrant, A. F., 1974. Strawberry latent ringspot virus. No. 126 In: *Description of Plant Viruses*, CMI/AAB, Surrey, UK



Wageningen University and Research
P.O. Box 35, 6700 AA Wageningen
Contact: martin.verbeek@wur.nl
T +31 (0)317 48 06 29
www.wageningenUR.nl

